

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I



TESIS DOCTORAL

**Contribución al conocimiento de AMPK como diana terapéutica a
través del descubrimiento de nuevos moduladores**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sergio J. Quesada Sánchez

Directora

Ana Castro Morera

Madrid, 2017

© Sergio J. Quesada Sánchez, 2016

***Contribución al conocimiento de AMPK
como diana terapéutica a través del
descubrimiento de nuevos moduladores***

Tesis

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas
por la Universidad Complutense de Madrid

Sergio J Quesada Sánchez

bajo la dirección de
Dra. Ana Castro Morera

Tesis doctoral realizada, escrita y editada en:

Instituto de Química Médica (IQM)
Centro de Química Orgánica Lora-Tamayo
Juan de la Cierva, 3, 28006, Madrid.

Madrid, 2016

A mis padres.

A la Dra. Ana Castro.



Dra. ANA CASTRO MORERA, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICA: Que el trabajo reflejado en la presente memoria, titulada “Contribución al conocimiento de AMPK como diana terapéutica a través del descubrimiento de nuevos moduladores” ha sido realizada en el Instituto de Química Médica del CSIC por SERGIO JAVIER QUESADA SÁNCHEZ y autoriza su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Madrid, mayo de 2016

Fdo. Dra. Ana Castro Morera

Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Química Médica (IQM) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), dentro del marco del proyecto de investigación CTQ2010-19690, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), y gracias a la concesión de una beca predoctoral del programa JAE (Junta para la Ampliación de Estudios) en el año 2011, cofinanciada por el CSIC y por el Fondo Social Europeo (FSE).

La tesis doctoral ha sido inscrita en el Programa de Doctorado en Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, y defendida en esta Facultad.

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de la presente tesis doctoral se ha realizado en el Instituto de Química Médica (IQM), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), bajo la dirección de la Dra. Ana Castro Morera. El primer agradecimiento debe ser para ella, por su experiencia, profesionalidad y dedicación, tanto como directora de esta tesis como del Instituto. Y especialmente por todas las oportunidades que me ha dado. Le debo mucho más que este trabajo.

A mi compañera de laboratorio Marta Vela, por toda su paciencia y generosidad.

A las entidades financiadoras de la beca JAEPre del año 2011 y del proyecto CTQ2010-19690. Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y al Instituto de Química Médica. A la Dra. M^a Jesús Pérez, en calidad de directora del Instituto durante buena parte del periodo de realización de este trabajo, y al personal de Gerencia y Administración del Instituto y del Centro de Química Orgánica Lora Tamayo.

Al personal del Laboratorio de Instrumental, Guadalupe Romero y Felipe Pérez. A Javier Renau, informático del Instituto. Al personal especializado del Centro de Química Orgánica Lora Tamayo: Elisa García y María Luisa Jimeno de Resonancia Magnética Nuclear, que además de los servicios prestados supervisaron algunos capítulos, y al servicio de espectrometría de masas y de microanálisis.

A los colaboradores con los que hemos tenido la suerte de contar: grupos del Prof. Pascual Sanz (Instituto de Biomedicina del CSIC de Valencia), de la Dra. Sara Ballester (Instituto de Salud Carlos III), de la Prof. Inés Díaz-Laviada (Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares) y de la Dra. María Soledad Fernández-Alfonso (Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid).

Y, sobre todo, a quien ha estado a mi lado durante estos casi cinco años, dentro y fuera del Instituto. Son lo más valioso que atesoro de esta etapa.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| 1.1 Estructura y funcionamiento de AMPK | 25 |
| 1.1.1 Catálisis y activación en la subunidad α | 29 |
| 1.1.2 Unión a carbohidratos, andamiaje y regulación en la subunidad β | 31 |
| 1.1.3 Modulación alostérica en la subunidad γ | 32 |
| 1.2 Funciones y regulación endógena de AMPK | 33 |
| 1.3 Activación farmacológica de AMPK | 35 |
| 1.3.1 Activadores indirectos | 36 |
| 1.3.2 Activadores directos | 39 |
| 1.4 AMPK como diana farmacológica | 46 |
| 1.4.1 AMPK y enfermedades metabólicas | 47 |
| 1.4.2 AMPK y cáncer | 50 |
| 1.4.3 AMPK y enfermedades inflamatorias | 51 |
| 1.4.4 AMPK y enfermedades neurodegenerativas | 52 |
| 1.4.5 AMPK y enfermedades vasculares | 53 |
| 1.5 Objetivos generales | 54 |
| Bibliografía del capítulo 1 | 56 |

CAPÍTULO 2

| | |
|--|-----|
| 2.1 Introducción y objetivos | 70 |
| 2.2 Resultados | 73 |
| 2.2.1 Síntesis | 73 |
| A. Síntesis de las 4-hidroxiquinolonas bromadas precursoras. | 73 |
| B. Acoplamientos de Suzuki-Miyaura. | 75 |
| 2.2.2 Estudios de activación enzimática frente a AMPK | 78 |
| 2.2.3 Estudio de solubilidad termodinámica | 79 |
| 2.2.4 Estudios de activación en células de AMPK | 80 |
| 2.2.5 Ensayos de la actividad antiinflamatoria | 81 |
| 2.3 Discusión | 84 |
| 2.4 Conclusiones | 86 |
| 2.5 Procedimientos experimentales | 87 |
| 2.5.1 Métodos generales | 87 |
| 2.5.2 Procedimientos de síntesis | 88 |
| 2.5.3 Ensayos in vitro de activación de AMPK | 100 |
| 2.5.4 Medidas de la activación en células de AMPK | 100 |
| 2.5.5 Ensayos de activación de células T de bazo de ratón | 102 |
| 2.5.6 Ensayos de medida de la solubilidad termodinámica | 103 |
| Bibliografía del capítulo 2 | 105 |

CAPÍTULO 3

| | |
|--|-----|
| 3.1 Introducción y objetivos | 112 |
| 3.2 Resultados | 114 |
| 3.2.1 Síntesis | 114 |
| 3.2.2 Evaluación biológica | 116 |
| A. Ensayos de actividad enzimática frente a AMPK | 116 |
| B. Estudio de activación en células de AMPK | 117 |
| C. Ensayos de viabilidad celular en cáncer de próstata | 119 |
| 3.2.3 Evaluación in silico del perfil tipo fármaco | 120 |
| 3.3 Discusión | 121 |
| 3.4 Conclusiones | 123 |
| 3.5 Procedimientos experimentales | 124 |
| 3.5.1 Métodos generales | 124 |
| 3.5.2 Procedimientos de síntesis | 124 |
| 3.5.3 Ensayos in vitro de activación de AMPK | 132 |
| 3.5.4 Ensayos de viabilidad celular | 132 |
| 3.5.5 Ensayos de activación en células de AMPK | 133 |
| Bibliografía del capítulo 3 | 134 |

CAPÍTULO 4

| | |
|--|-----|
| 4.1 Introducción y objetivos | 138 |
| 4.2 Resultados y discusión | 141 |
| 4.2.1 Identificación de los nuevos prototipos | 141 |
| A. Síntesis y evaluación del derivado de espiro [indolina-pirazol] pirididona | 141 |
| B. Determinación del pK _a e implicaciones estructurales | 146 |
| C. Reacción de fluoración y evaluación biológica de los diastereómeros | 148 |
| D. Asignación estructural | 150 |
| 4.2.2 Optimización de los prototipos derivados de espiro [indolina-pirazol] pirididona | 152 |
| A. Síntesis | 152 |
| B. Estudios de activación enzimática frente a AMPK | 155 |
| C. Estudios de activación en células de AMPK | 157 |
| 4.2.3 Síntesis y evaluación biológica de derivados modificados de espiro-indolina | 159 |
| A. Espiro indolina-pirano-pirazoles | 159 |
| B. Espiro indolina-pirazol piridina | 160 |
| C. Espiro[indolina-piridinas] y espiro[indol-pirazol-piridinas] | 160 |
| D. Espiro indolina-piperidina | 161 |
| E. Evaluación biológica y estudios de relación estructura- actividad | 162 |
| 4.3 Estudio de fosforilación en células endoteliales | 163 |
| 4.4 Conclusiones. | 165 |
| 4.5 Procedimientos experimentales. | 166 |
| 4.5.1 Métodos generales. | 166 |
| 4.5.2 Procedimientos de síntesis | 166 |
| 4.5.3 Ensayos in vitro de activación de AMPK | 191 |
| 4.5.4 Medidas de la activación en células de AMPK | 191 |

| | |
|---|-----|
| <i>4.5.5 Ensayos de fosforilación de AMPK vascular</i> | 193 |
| Bibliografía del capítulo 4 | 196 |
| CONCLUSIONES GENERALES | 201 |

NOTA SOBRE NOMENCLATURA

Con el fin de mantener la misma numeración y facilitar la comparación de los datos espectroscópicos, se le ha dado prioridad a los sustituyentes del nucleósido a lo largo de esta Memoria. Además ha utilizado la nomenclatura de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB (*“Nomenclature and Symbolism for Aminoacids and Peptides”*). Los aminoácidos se han nombrado por el sistema de código de tres letras y pertenecen a la serie natural L. En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene el grupo amino libre, o no acilado por otro aminoácido, se denomina *N*-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre se denomina *C*-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente, se comienza por el residuo *N*-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo *C*-terminal.

NOTA SOBRE PUNTUACIÓN

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de puntuación en la numeración inglesa, se ha utilizado este sistema en la parte experimental de la Memoria de esta Tesis Doctoral. Así, las cifras decimales se indican con puntos en lugar de con comas, aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el Diccionario Panhispánico de Dudas desde su primera edición en octubre de 2005.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|------------------|---|
| ACC | Acetil-CoA Carboxilasa |
| ADAM | <i>Allosteric Drug And Metabolite site</i> |
| AICAR | <i>5-Aminolimidazole-4-CARboxamide Ribonucleotide</i> |
| AIS | <i>AutoInhibitory Sequence</i> |
| AMPK | <i>5'-Adenosine MonoPhosphate-activated protein Kinase</i> |
| anh | Anhidro/a |
| ADP | <i>Adenosine DiPhosphate</i> |
| ATP | <i>5'-Adenosine triPhosphate</i> |
| CaMKK | <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein Kinase Kinase</i> |
| CBM | <i>Carbohydrate-Binding Module</i> |
| CBS | <i>Cystationine-β-Sintase</i> |
| CD | Clúster de Diferenciación |
| COSY | <i>COrrrelation SpectroscopY</i> |
| DCE | 1,2-Dicloroetano |
| DCM | Diclorometano |
| DMAP | Dimetilaminopiridina |
| DMF | Dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| eEF2K | <i>Eukaryotic Elongation Factor-2 Kinase</i> |
| EC ₅₀ | <i>Effective Concentration 50</i> |
| EGCG | <i>Epigallocatechin gallate</i> |
| ELA | Esclerosis Lateral Amiotrófica |
| GLUT | <i>Glucose transporter</i> |
| GSK | <i>GlaxoSmithKline</i> |
| HEK | <i>Human Embryonic Kidney</i> |
| HMBC | <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> |
| HMGR | <i>3-hidroxi-3-MetilGlutaril-CoA Reductasa</i> |
| HOESY | <i>Heteronuclear Overhauser Effect SpectroscopY</i> |
| HSL | <i>Hormone-Sensible Lipase</i> |
| HPLC-MS | <i>High Pressure Liquid Cromatography – Mass Spectrometry</i> |
| HTS | <i>High Throughput Screening</i> |
| IFN | Interferón |

| | |
|--------|---|
| IL | Interleucina |
| INEPT | <i>Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer</i> |
| KCD | <i>Kinase Catalytic Domain</i> |
| LKB1 | <i>Liver Kinase B1</i> |
| MCR | <i>Macroglobulin Complement-Related</i> |
| MTT | <i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> |
| NBS | N-bromosuccinimida |
| NOESY | <i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i> |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| 6PFK2 | <i>6-Phosphofructokinase 2</i> |
| PC | <i>Prostate Cancer</i> |
| PCC | <i>Pyridinium ChloroChromate</i> |
| PNT | <i>Prostate Normal Tissue</i> |
| PP | <i>Protein Phosphatase</i> |
| Raptor | <i>Regulatory-associated protein of mTOR</i> |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear |
| RIM | <i>Regulatory subunit Interacting Motif</i> |
| SAR | <i>Structure-Activity Relationship</i> |
| SBS | <i>Subunit Binding Sequence</i> |
| SID | <i>Subunit Interacting Domain</i> |
| TAK | <i>Transforming growth factor-β-Activated protein Kinase</i> |
| T2DM | <i>Type-2-Diabetes Mellitus</i> |
| TCR | <i>T Cell Receptor</i> |
| THF | Tetrahidrofurano |
| TLC | <i>Thin Layer Chromatography</i> |
| TNF | <i>Tumoral Necrosis Factor</i> |
| TSC | <i>Tuberous Sclerosis Protein</i> |
| TZD | Tiazolidinadionas |
| ZMP | 5-aminoimidazol-4-carboxamida dinucleótido |

Resumen

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es un sensor de la energía celular que, una vez activado, juega un papel fundamental en muchos procesos que tienen lugar en la célula y que están encaminados a restaurar la homeostasis energética. Esta proteína activa e intensifica rutas y procesos catabólicos para generar ATP, como la β -oxidación de ácidos grasos y la autofagia, e inhibe procesos y rutas anabólicas que consumen energía, como la síntesis de ácidos grasos, colesterol y proteínas. Está presente en todos los organismos eucariotas, y en el caso de los humanos, se encuentra en prácticamente todos los tejidos y órganos: hígado, riñón, músculo y músculo esquelético, tejido vascular, neuronas, tejido adiposo, sistema inmunológico...

Esta ubicuidad, entre especies, entre tejidos y entre rutas metabólicas la convierte en imprescindible en el correcto funcionamiento celular. Desde su descubrimiento, esta proteína viene concentrando un creciente interés en los campos de la química médica, la farmacología, la biología molecular y la medicina. Esto ha hecho que poco a poco avance nuestro conocimiento sobre las formas en las que esta proteína lleva a cabo su función, sobre sus mecanismos de activación y regulación y sobre la forma en que coordina unos y otros campos de la homeostasis, metabolismo energético, inmunología, crecimiento y ciclo celular, etcétera, para originar una respuesta cohesionada, y por tanto sana, a las situaciones de consumición de las reservas de energía.

Además, resulta evidente que una proteína con un papel tan capital como AMPK debe estar involucrada en numerosas enfermedades. Su desregulación o funcionamiento anómalo por cualquier causa están asociados a patologías que pueden afectar a cualquier zona del organismo: desde el cáncer a enfermedades neurodegenerativas, pasando por la diabetes, el síndrome metabólico, la obesidad, el síndrome de Wolff-Parkinson-White y alteraciones vasculares. Y, como pasaba con su funcionamiento en condiciones sanas, cada vez tenemos una información más completa del inmenso abanico de alteraciones en las que AMPK está involucrada, en todas ellas desempeñando un papel importante.

Por todo esto, AMPK es una diana terapéutica prometedora y poderosa para el posible tratamiento de todas estas afecciones. De hecho, AMPK es ya la diana de fármacos contra la diabetes, como la metformina, o contra el cáncer, como *Sunitinib*, que ejerce, al menos parcialmente, su acción vía AMPK. También se conocen, algunos desde hace mucho tiempo, numerosos productos naturales con efectos beneficiosos que a la postre actúan a través de la modulación de AMPK. Otros muchos moduladores de AMPK, principalmente

activadores, de origen farmacológico o natural (endógenos, hormonales, naturales...) están en proceso de desarrollo en etapas clínicas.

Es en este punto donde se encuadra la aportación de este trabajo, que contiene la síntesis y evaluación de nuevas familias de moléculas como moduladores de AMPK. Concretamente, las familias de compuestos sintetizadas son: en primer lugar, las quinolonas, descritas en el segundo capítulo, e inspiradas en algunos de los compuestos más asentados en su uso como contraste de eficacia en la interacción con AMPK, como el prototipo A-769662 de Abbott. Estos compuestos demostrarán resultados especialmente interesantes en el campo de solapamiento entre el metabolismo energético y los procesos inflamatorios.

En el tercer capítulo, los oxoindoles, un motivo estructural presente, entre otros ejemplos, en *Sunitinib*, un compuesto singular en el campo de la modulación de AMPK, por actuar como inhibidor y, como se ha dicho, por su extendido uso contra el cáncer de próstata. Por esto, los compuestos serán ensayados como anticancerígenos a través de su interacción con AMPK.

Y por último, se preparará una familia de compuestos totalmente novedosa, todos ellos con estructura espiránica y sintetizados mediante rutas multicomponente, y por tanto rápidas y efectivas. Estos compuestos demuestran una buena potencia en células, que combinada con los resultados *in vitro* obtenidos dibujan nuevos horizontes en el campo de la modulación de AMPK.

Abstract

AMP-activated protein Kinase (AMPK) is a cellular energy sensor which, once active, plays a key role in many processes taking place in the cell and that are designed to restore energy homeostasis. This protein activates and intensifies catabolic routes and processes in order to generate ATP, such as fatty acids β -oxidation or autophagy, and inhibits energy-consuming anabolic routes and processes, such as fatty acids, cholesterol and proteins synthesis. It is present in all eukaryotic organisms, and in the case of humans, it is virtually present in all tissues and organs: liver, kidney, muscle and skeletal muscle, vascular tissue, neurons, adipose tissue, immune system...

This ubiquity between species, tissues and metabolic pathways makes it essential in the proper cell function. Since its discovery, this protein has concentrated an increasing interest in the fields of medicinal chemistry, pharmacology, molecular biology and medicine. This has made advance our understanding about the ways in which this protein performs its function, about its activation and regulation mechanisms and about how it coordinates all the fields of homeostasis, energy metabolism, immunology, cellular growth and cycle, etc., to perform a cohesive and healthy response to events consuming the energy reserves.

Furthermore, it is evident that a protein with such a central role must be involved in numerous diseases. Deregulation or malfunction because of any reason are associated with diseases that may affect to any part of the organism: from cancer to neurodegenerative diseases to diabetes, metabolic syndrome, obesity, Wolff-Parkinson-White syndrome and vascular alterations. And, as happen with its function in healthy conditions, we have an increasing information about the immense range of disorders in which AMPK is involved, playing an important role in all of them.

That is why AMPK is a promising and powerful therapeutic target for the possible treatment of these diseases. In fact, AMPK is already the target of drugs against diabetes, such as metformin, or against cancer, such as *Sunitinib*, which partially exerts its action via AMPK. There are also known for a long time numerous natural compounds with beneficial effects that act through AMPK modulation. Many other pharmacological or naturally occurring AMPK modulators, mainly activators (endogenous, hormonal, natural...) are under clinical development.

This work fits at this point, describing the synthesis and evaluation of new families of compounds as AMPK modulators. Specifically, these families are: first, quinolones, described in the second chapter, and inspired by some of the best established compounds used to evaluate the efficiency of the interaction with the protein, as the Abbott prototype A-769662. These compounds will show interesting results in the field of overlap between energy metabolism and inflammatory processes.

In the third chapter, oxoindole, a structural motif present, among other examples, in *Sunitinib*, an important compound modulating AMPK because it acts as an inhibitor and, as has been said, by its widespread use in prostate cancer. That is why compounds will be tested as anticancer agents through its interaction with AMPK.

Finally, it will be prepared a totally novel family of compounds with spiranic structure and synthesized by multicomponent, and therefore fast and effective, routes. These compounds will show a good potency in cells, which combined with the results obtained *in vitro*, suppose new challenges in the field of AMPK modulation.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

| | |
|--|-----------|
| 1.1 Estructura y funcionamiento de AMPK | 25 |
| 1.1.1 Catálisis y activación en la subunidad α | 29 |
| 1.1.2 Unión a carbohidratos, andamiaje y regulación en la subunidad β. | 31 |
| 1.1.3 Modulación alostérica en la subunidad γ | 32 |
| 1.2 Funciones y regulación endógena de AMPK | 33 |
| 1.3 Activación farmacológica de AMPK | 35 |
| 1.3.1 Activadores indirectos | 36 |
| 1.3.2 Activadores directos | 39 |
| 1.4 AMPK como diana farmacológica | 46 |
| 1.4.1 AMPK y enfermedades metabólicas | 47 |
| 1.4.2 AMPK y cáncer | 50 |
| 1.4.3 AMPK y enfermedades inflamatorias | 51 |
| 1.4.4 AMPK y enfermedades neurodegenerativas | 52 |
| 1.4.5 AMPK y enfermedades vasculares | 53 |
| 1.5 Objetivos generales | 54 |
| Bibliografía del capítulo 1 | 56 |

1. Introducción

La proteína AMPK (*Adenosyl MonoPhosphate-activated protein Kinase*) se clasifica como una quinasa heterotrimérica de tipo serina-treonina, perteneciente a una familia muy conservada con ortólogos en todos organismos eucariotas, lo que evidencia su presencia desde momentos muy tempranos del proceso evolutivo ¹⁻².

Esto es así debido a la gran importancia que tiene, puesto que actúa como un sensor energético clave ³⁻⁴. AMPK se activa cuando las reservas de energía celulares, es decir, la concentración de ATP, comienzan a escasear. Esto sucede bajo cualquier tipo de esfuerzo o estrés biológico, desde el ejercicio físico o la privación de alimentos hasta la isquemia o la hipoxia. Es entonces cuando AMPK pone en marcha una amplia serie de procesos fisiológicos que conjuntamente dan lugar a un incremento de la producción de energía y a una disminución del gasto de ATP, convirtiendo a AMPK en una proteína fundamental para el control del metabolismo energético en los seres vivos, y por tanto para el correcto mantenimiento de la homeostasis y la supervivencia. AMPK está presente tanto en el núcleo como en el citoplasma, así como en casi todos los tejidos del organismo: hígado, músculo y músculo esquelético, adiposo, cardíaco, nervioso. Esta ubicuidad permite que estas respuestas se lleven a cabo rápidamente y de forma coordinada ¹.

AMPK, como proteína quinasa, desempeña su función a través de la fosforilación de proteínas plasmáticas. Esto provoca el ajuste gradual de la actividad de muchas rutas y procesos metabólicos, como la transcripción de genes, el crecimiento y la proliferación celular, la biogénesis de mitocondrias ⁵ y otros muchos que están continuamente saliendo a la luz gracias a las aportaciones de grupos de investigación de todo el mundo, conscientes de su potencial e interés ¹. Se puede adelantar que casi todas las rutas del metabolismo energético, tanto catabólicas como anabólicas, están controladas e integradas entre sí de alguna forma a través de AMPK ¹. En su forma activa, AMPK estimula la oxidación de ácidos grasos, la captación de glucosa, la glucólisis y la autofagia, inhibe la proliferación celular, la glucogenogénesis y la síntesis de ácidos grasos, colesterol y proteínas.

AMPK fue descubierta en 1987 por D. Carling, V. A. Zammit y D. G. Hardie ⁶. Estos autores la identificaron como un complejo enzimático desconocido hasta entonces que regulaba la biosíntesis de colesterol a través de la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la 3-

hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMGR)⁶. Su trabajo estableció que AMPK era clave en la regulación del metabolismo de lípidos, y desde entonces no se han dejado de realizar aportaciones que han puesto de relieve su importancia¹.

1.1 Estructura y funcionamiento de AMPK

El conocimiento de la estructura y los mecanismos de acción de AMPK ha provenido hasta hace relativamente poco de los datos suministrados exclusivamente por estudios de sus tres subunidades por separado. AMPK es un heterotrímero de tipo $\alpha\beta\gamma$, donde la subunidad α desempeña funciones catalíticas, y la β y γ , funciones estructurales y reguladoras^{1, 5, 7-8}. El primer cristal de AMPK completo se obtuvo para *Saccharomyces cerevisiae* en 2007⁹, y para mamíferos en 2011¹⁰. La subunidad α ha presentado problemas de estudio debido a su divergencia entre especies, de ahí la importancia de la obtención de la estructura cristalina de la isoforma $\alpha 1$ aislada, en 2013¹¹.

Existen múltiples isoformas de cada subunidad en los seres vivos: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$, lo cual ofrece la posibilidad de 12 combinaciones distintas, diferenciándose entre sí en la especificidad de tejido, localización subcelular y funciones de señalización¹².

Actualmente se sabe que los complejos que contienen la isoforma $\alpha 1$ están predominantemente expresados en el hígado y el tejido adiposo, mientras que $\alpha 2$ lo está en el cerebro, corazón y músculo esquelético. Además, $\alpha 1$ favorece la localización no nuclear en la célula, y $\alpha 2$ tiende a localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma. En cuanto a la subunidad β , $\beta 1$ está expresada mayoritariamente en hígado, páncreas, riñón, tejido adiposo marrón y cerebro, y $\beta 2$ en músculo cardíaco y esquelético¹. La subunidad γ muestra poca especificidad tisular, si bien $\gamma 1$ está más expresada en hígado, riñón, pulmones y músculo esquelético, y $\gamma 2$ en las células endoteliales del corazón⁵.

La **figura 1.1** muestra la estructura cristalina del aducto de AMPK, concretamente el heterotrímero $\alpha 1\beta 2\gamma 1$, con la β -ciclodextrina, la estaurosporina y AMP, con el sitio Thr172 fosforilado¹³. En esta figura se detallan todos los elementos estructurales que se describen a continuación.

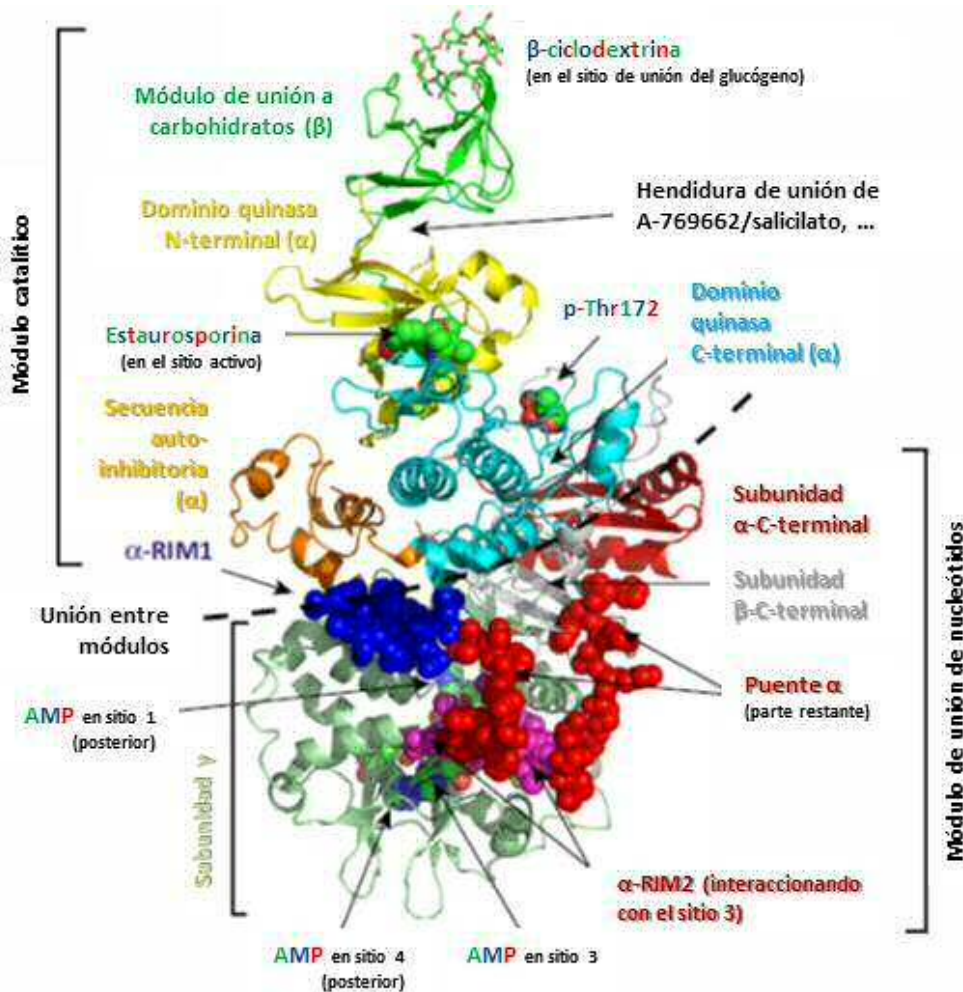


Figura 1.1. Estructura cristalina del heterotrímero $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ de AMPK humana complejoado con β-ciclodextrina, estaurosporina y AMP, con Thr-172 fosforilado. Tomado de Hardie y col., 2016.

Las distintas subunidades se estructuran de la siguiente manera (**figura 1.2**):

- **Subunidad α**, que contiene:
 - Un dominio N-terminal de actividad quinasa de tipo serina/treonina: KCD, *kinase catalytic domain*. Este KCD contiene el bucle de activación, en el que se encuentra el sitio de activación primaria de AMPK: el residuo Thr-172.
 - Tras él, una secuencia autoinhibitoria: AIS, *autoinhibitory sequence*, que inhibe el dominio quinasa en ausencia de AMP. Está unida a el extremo C-terminal por el denominado “puente-α”, importante en la regulación por parte de AMP porque contiene unas secuencias, denominadas “reguladoras de las interacciones entre subunidades” (α-RIM, *α Regulatory subunit Interacting*

Motif), que interaccionan con la subunidad γ cuando AMP está unido al sitio de unión número 3¹³.

- Un dominio C-terminal que interacciona con el extremo C-terminal de la subunidad β , necesario para la formación del heterotrímero estable $\alpha\beta\gamma$: β -SID, *β -subunit interacting domain*.
- La **subunidad β** , que contiene:
 - Un módulo de unión a carbohidratos, CBM, *carbohydrate-binding module*, con diferente afinidad según la isoforma, con funciones reguladoras y de localización.
 - Una secuencia C-terminal que tiene funciones de andamiaje con las otras dos subunidades: $\alpha\gamma$ -SBS, *α/γ subunit binding sequence*. Es la zona que más contribuye a la estabilidad del heterotrímero gracias a la formación de un interdominio con las otras dos subunidades.
- La **subunidad γ** . Está formada por cuatro secuencias repetidas conocidas como cistationina- β -sintasa, CBS, frecuentes en otras proteínas, como los canales de cloruro en eucariotas. En todas ellas aparecen siempre por parejas, cada una de las cuales se llama **dominio de Bateman**, y son las zonas de unión de los nucleótidos regulatorios AMP y ATP¹⁴.

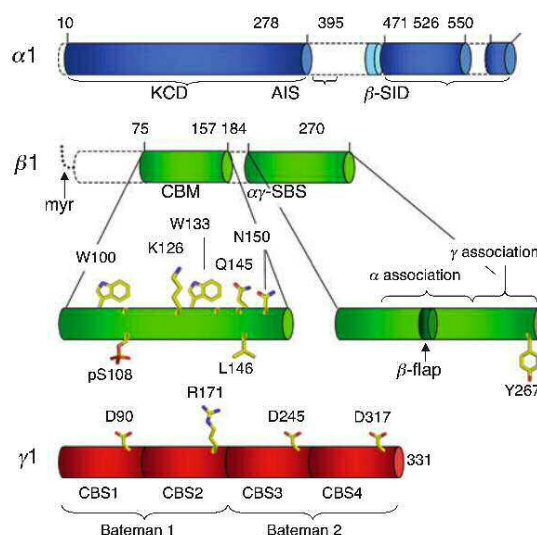


Figura 1.2. Organización de dominios de las subunidades de AMPK. Se colorean las regiones de estructura conocida. En la subunidad β se muestran los residuos implicados en la unión con β -ciclodextrina. En la γ , se muestran los residuos propuestos para la unión con los hidroxilos 2' y 3' de la ribosa de AMP. Tomado de Oakhill y col., 2009.

De entre todos los mecanismos de activación de AMPK (**figura 1.3**), hay dos que son mejor conocidos que los demás:

En primer lugar, el comentado proceso de activación primaria a través de la fosforilación del residuo Thr-172 (en $\alpha 2$, Thr-183 en $\alpha 1$) del KCD. Esto quiere decir que si esta fosforilación no tiene lugar, AMPK se encontrará en estado inactivo y no llevará a cabo su función, independientemente del resto de factores. Se conocen tres quinasas capaces de catalizar esta fosforilación: LKB1 (*Liver Kinase B1*), producto de un gen supresor de tumores y asociada al síndrome de Peutz-Jeghers; TAK1 (*Transforming growth factor- β -activated protein kinase*), cuyo papel fisiológico aún no se conoce bien, y CaMKK β (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase*). Esta última puede ser la ruta principal de fosforilación en el cerebro, debido a que su expresión es mayor en este órgano. Además, incrementos en la concentración de Ca²⁺ acompaña a la activación de proteínas motoras y a la consumición de energía, con lo que la activación por esta vía puede ser el mecanismo que alerte de la consumición de ATP, especialmente en neuronas, células endoteliales y linfocitos T.

Por su parte, las fosfatasas relevantes para AMPK en mamíferos *in vivo* aún no están firmemente identificadas. Las fosfatasas tipo 2A y 2C α desfosforilan la treonina del bucle de activación *in vitro*. Estudios con células de mamíferos implicaron también a Ppm1E, Ppm1F (ambas muy relacionadas con PP2C), y PP1-R¹⁵.

El segundo mecanismo de activación es un proceso de regulación de la actividad de AMPK ya fosforilada en Thr-172, consistente en la modulación alostérica mediada por la relación de concentraciones [AMP]/[ATP] en el medio celular. Esto quiere decir que AMP es un activador alostérico directo de AMPK y que ATP antagoniza sus efectos compitiendo por los mismos sitios de unión.

Si bien es cierto que el primer proceso representa el determinante de la actividad, también lo es que existe cierto grado de solapamiento entre ellos, puesto que la unión de AMP a la subunidad reguladora γ protege a AMPK frente a la defosforilación de Thr-172 por sus fosfatasas específicas, permitiendo por tanto la acumulación de pThr-172-AMPK.

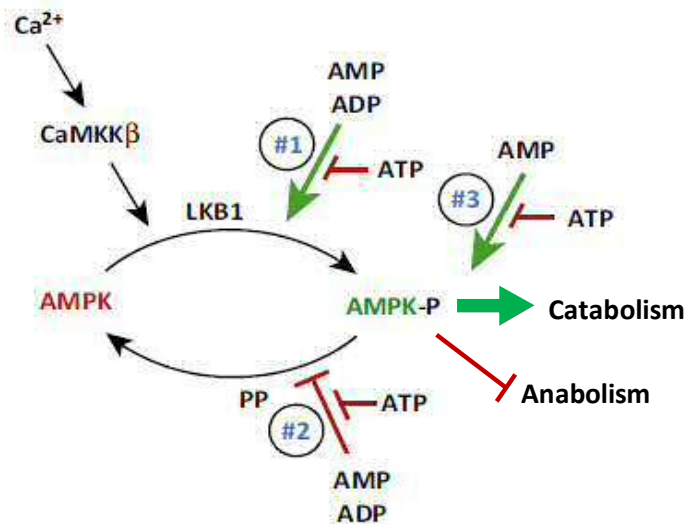


Figura 1.3. Esquema del funcionamiento de AMPK. En él se muestra cómo la unión de AMP activa AMPK mediante tres efectos: promoción de la fosforilación de Thr172 por LKB1 (#1), inhibición de la defosforilación por las protein fosfatases (PP, #2) y activación alostérica (#3). Estos tres efectos son contrarrestados por la unión de ATP, mientras que la de ADP mimetiza los efectos #1 y #2, pero no el #3. $\text{CaMKK}\beta$ fosforila el mismo sitio que LKB1 (Thr172) en respuesta a los incrementos de Ca^{2+} celular. Tomado de Haride *et al.*, 2016.

1.1.1 Catálisis y activación en la subunidad α .

La subunidad α es donde reside la actividad quinasas. Concretamente en el KCD, que se sitúa en el extremo N-terminal de la subunidad y contiene el sitio activo. Todas las quinasas del tipo serina/treonina tienen un sitio activo similar. El KCD adopta una estructura bilobular, conteniendo nueve hélices α ($\alpha\text{A} - \alpha\text{I}$) y cinco láminas β ($\beta\text{1} - \beta\text{5}$, ver **figura 1.4 a**):

- El lóbulo N-terminal contiene las láminas β , y se encarga coordinar el ATP. Entre β3 y β4 se encuentra una de las hélices, la αC , que contiene el residuo Glu-64, que interacciona con los fosfatos del ATP para alinearlos en la posición correcta para la catálisis. Por otro lado, conectando β3 y β4 hay una secuencia Gly-X-Gly-X-X-Gly. Esta secuencia interacciona con el fosfato β del ATP cuando el sitio activo es ocupado.
- El lóbulo C-terminal contiene las seis hélices entre αD y αI , y en él se encuentra el sitio activo, localizado entre los residuos His-133 y Glu-143. El residuo invariante de Asp, Asp-141 en α1 y Asp-139 en α2 , funciona como base frente al sustrato en la catálisis.

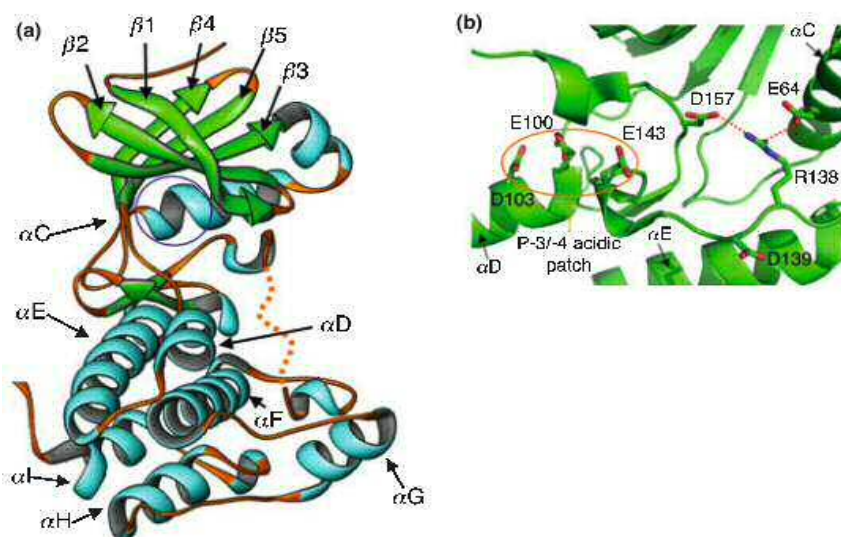


Figura 1.4. (a) El dominio $\alpha 2$ con el bolsillo de unión a ATP en azul. La línea discontinua naranja representa la secuencia de activación que contiene Thr-172, el loop de activación. (b) El sitio de unión al sustrato. Glu-100, Asp-103 y Glu-103 están redondeados en naranja. Los enlaces de hidrógeno que inactivan el sitio de unión de ATP en la subunidad γ se muestran con líneas discontinuas. Tomado de Oakhill y col., 2009.

El sitio activo forma un surco entre ambos lóbulos. Este surco es común en la familia de las quinasas eucariotas. En el caso de AMPK, está contenido en una zona de bisagra que permite la rotación relativa de un lóbulo respecto al otro. En este sitio activo es fundamental el residuo Arg-157, puesto que se une al ion Mg^{2+} que coordina los fosfatos β y γ del Mg^{2+} -ATP. En ausencia de Mg^{2+} -ATP, el bolsillo de unión de ATP se vuelve inactivo por dos interacciones iónicas entre Arg-138, Asp-157 y Glu-64 en la hélice C.

También en esta zona se localiza el bucle de activación, que contiene la mencionada Thr-172. Cuando este residuo está fosforilado, el grupo fosfato neutraliza Arg-138. En ausencia de este fosfato, Arg-138 está neutralizado por Glu-64 y Asp-157, lo cual provoca una restricción conformacional que impide adoptar las orientaciones requeridas para el correcto alineamiento de ATP y la coordinación del Mg^{2+} .

Finalmente, tras el dominio N-terminal se encuentra la denominada secuencia autoinhibitoria, AIS (*AutoInhibitory Sequence*). Es una secuencia C-terminal al KCS. Li *et al.* han llevado a cabo estudios sobre estructuras cristalinas de la holoenzima $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ -AMPK unida a AMP y ciclodextrina, así como sobre estructuras cristalinas del complejo KCD-AIS¹⁶. Este trabajo pone

de manifiesto que existe un mecanismo de modulación alostérica de AMPK mediante AMP y glucógeno. La unión de estos dos reguladores modifica las interacciones en equilibrio entre AIS y el módulo de unión a carbohidratos (CBM) de la subunidad β . Esto supone un mecanismo adicional de regulación.

1.1.2 Unión a carbohidratos, andamiaje y regulación en la subunidad β .

La subunidad β tiene una triple función. En primer lugar, mantener unidas y coordinar las otras dos subunidades a través del $\alpha\gamma$ -SBS, como ya se ha comentado.

En segundo lugar, mediar la unión a glucógeno y a membranas a través del CBM, permitiendo a AMPK detectar cambios en los niveles de carbohidratos en la célula. Está relacionado con los dominios no catalíticos encontrados en enzimas que metabolizan glucógeno o almidón. Es el responsable de la unión de AMPK a las partículas de glucógeno en las células¹⁷⁻¹⁸. Estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) han puesto de manifiesto la preferencia del CBM por oligosacáridos de más de 5 unidades de longitud que estén unidos mediante enlaces glucosídicos- α -1,4 y cuyas ramas unan entre sí mediante enlaces α (1-6), tal y como sucede en el glucógeno. Esto sugiere que la acumulación de AMPK se incrementa en los momentos de consumición de glucógeno, donde los azúcares unidos por enlaces α -1,6 permanecen intactos mientras que las cadenas de enlaces 1,4 son las que se degradan por las fosforilasas.

En tercer lugar, modula la actividad de AMPK a través de mecanismos adicionales. Como se ha visto, el CBM está involucrado en la interacción con el AID, ofreciendo una vía adicional de autorregulación. Pero el principal medio de esta subunidad para la modulación de la actividad es el residuo Gly-2 (en β 1), que está miristoilado. La eliminación de la miristoilación por mutación a alanina tiene un doble efecto: una migración desde la membrana hacia el citoplasma y una gran disminución de la actividad basal de AMPK. El primer efecto, la relocalización subcelular, se debe a que la región N-terminal contribuye al anclaje a membranas citoplasmáticas, a través tanto de interacciones iónicas como de uniones específicas con proteínas de membrana. El segundo efecto supone un segundo nivel de autoinhibición de la proteína, no redundante con el alosterismo por AMP, ya que lo hace a través de dificultar la fosforilación de Thr-172.

1.1.3. Modulación alostérica en la subunidad γ .

Como se ha comentado anteriormente, están formadas por cuatro secuencias CBS repetidas, numeradas según su distancia al extremo N-terminal. Los pares CBS1+2 y CBS3+4 están empaquetados a través de láminas β antiparalelas, generando dos dominios de Bateman.

La zona en la que se alojan los nucleótidos es el bolsillo entre estas dos láminas β antiparalelas de cada dominio de Bateman, y se encuentran estabilizado por tres tipos de enlaces (**figura 1.5**): enlaces de hidrógeno bidentados entre un residuo de aspártico y los hidroxilo 2' y 3' de la ribosa; enlaces de hidrógeno entre la adenina y grupos de la cadena principal; y enlaces iónicos entre los grupos fosfato y cadenas básicas adyacentes.

No obstante, los nucleótidos sólo se unen a dos de los cuatro CBS. En el caso de CBS2, el residuo de aspártico está sustituido por una mutación natural por uno de aspártico, por lo que siempre está inocuado. Y en el de CBS4, siempre está ocupado por AMP, de forma no intercambiable, ya que se establecen interacciones adicionales ribosa-Thr y fosfato-Ser que hacen irreversible la unión. Por tanto, AMPK tiene realmente sólo dos sitios alostéricos, por los que compiten AMP y ATP provocando efectos antagónicos.

CBS1 se une a los nucleótidos 30 veces más fuertemente que CBS3, por lo que este último es más responsable del efecto alostérico. La unión a CBS3 provoca un considerable cambio conformacional de His297, que promueve a su vez otro cambio conformacional en todo el complejo AMPK y su activación alostérica. AMPK no provoca estos cambios conformacionales, y por tanto actúa como un inhibidor al competir con AMP.

Además, este cambio conformacional en AMPK tiene dos efectos adicionales: la hace menos sensible a la acción de sus fosfatasas específicas sobre Thr-172 y estimula la fosforilación de este residuo por parte de sus quinasas.

En cuanto a ADP, también compite por los sitios activos, pero no provoca activación alostérica, aunque sí protege contra las fosfatasas, probablemente a través de su unión al sitio 1¹⁰.

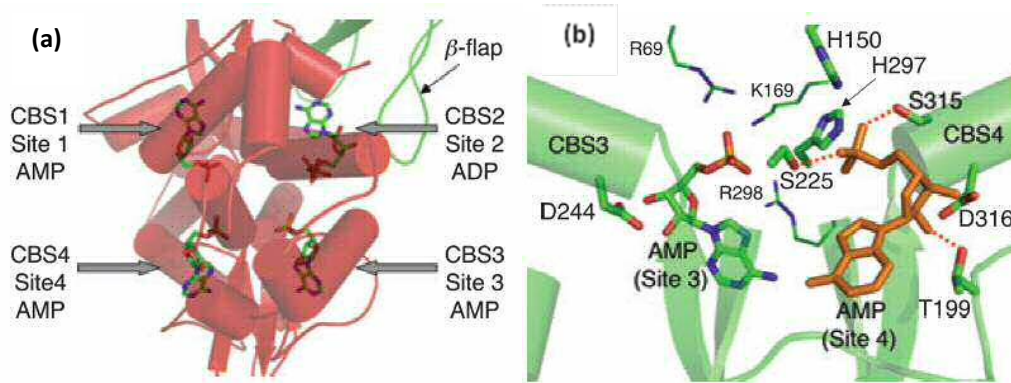


Figura 1.5 (a) Ampliación de $\gamma 1$ mostrando la posición relativa de los tres sitios de unión a nucleótidos ocupados por AMP, con ADP en el CBS 2. **(b)** Comparación de los sitios de unión de nucleótidos 3 (intercambiable) y 4 (no intercambiable) en $\gamma 1$ de *S. Cerevisiae*. El AMP se muestra en naranja. Los residuos básicos que contribuyen a la unión en el sitio 3 se muestran como líneas, y los que contribuyen al sitio 4 como barras. Los enlaces de hidrógeno adicionales que se proponen para incrementar la afinidad respecto al sitio 4 se muestran como líneas rojas de puntos. Tomado de Oakhill y col., 2009.

La isoforma $\gamma 2$ es más sensible a la activación alostérica que $\gamma 3$, probablemente porque los nucleótidos se unen con más fuerza a esta isoforma.

El máximo grado de activación alostérica provoca un aumento de la actividad basal de la proteína en un factor de 1000, comparado con el estado no fosforilado en Thr-172 (para $\alpha 2$), y de 10 comparado con el estado completamente fosforilado.

1.2 Funciones y regulación endógena de AMPK

De forma concisa, se podrían clasificar los mecanismos de los que dispone AMPK para modular la homeostasis energética mediante la acción que despliega a tres niveles: metabólico, celular y de todo el organismo^{1,5}.

A nivel metabólico, AMPK media la fosforilación de enzimas clave en rutas que incluyen el metabolismo de glúcidos, el de lípidos y el de proteínas, y también procesos de transcripción génica. Como se ha comentado, esta fosforilación está encaminada al incremento y el mantenimiento de las reservas energéticas, es decir, conllevan activación de rutas catabólicas o detención de rutas anabólicas^{1,5}.

- En el metabolismo de glúcidos, AMPK favorece la captación de glucosa por parte de los tejidos periféricos mediante la fosforilación e inactivación de las proteínas TBC1D1 y

TBC1D4, lo cual provoca la migración de proteínas GLUT (encargadas de dirigir el proceso de captación de glucosa) de las vesículas a la membrana celular. Además, AMPK regula la transcripción de genes que codifican otras proteínas que también tienen funciones importantes en este proceso. Por otro lado, AMPK inhibe la biosíntesis de glucógeno en muchos tejidos fosforilando e inactivando la glucógeno sintasa, favorece la glucólisis (a través de la activación de 6PFK2) e inhibe la gluconeogénesis a través de numerosos mecanismos^{1,5}.

- El metabolismo de lípidos es igualmente dominado por AMPK, a través de mecanismos más diversos. Es capaz de inhibir la biosíntesis de ácidos grasos mediante fosforilación de acetil-CoA carboxilasa (ACC), inhibe la transcripción de genes lipogénicos, promueve la oxidación de ácidos grasos fosforilando ACC2, también fosforila la lipasa sensible a las hormonas (HSL), lo que retarda la síntesis de triglicéridos. Aunque el mecanismo aún no está claro, AMPK también está involucrada en la activación de la captación de ácidos grasos a la membrana plasmática. Además, AMPK inhibe la síntesis de colesterol y otros isoprenoides así como la de triglicéridos y fosfolípidos^{1,5}.
- Por último, AMPK inhibe la síntesis de proteínas a través tanto de la fosforilación de proteínas como TSC, Raptor o eEF2K, que forman parte de rutas que integran diferentes tipos de señales con la síntesis de proteínas^{1,5}.

A nivel celular, AMPK está implicada en numerosos procesos clave en la vida de la célula, como la biogénesis de mitocondrias, el crecimiento y la proliferación celular, la polaridad celular, la apoptosis y la autofagia.

Las funciones de AMPK en el ciclo celular se realizan a través de la fosforilación de los llamados reguladores del ciclo celular p53 y p27, que detienen el ciclo celular en la fase G1/S, promoviendo así la autofagia.

Por otro lado, AMPK fosforila varios factores de transcripción involucrados en muy diversas funciones, como la respuesta al estrés oxidativo, la expresión de genes que regulan el crecimiento celular y genes nucleares necesarios para la respiración, la biosíntesis de grupos hemo, la transcripción y replicación de ADN mitocondrial o la regulación de la función vascular.

A nivel del organismo, AMPK interviene en muchas rutas de señalización hormonal, regulando el sistema endocrino, controlando el sistema neuroendocrino del apetito y, a su vez, siendo regulada por numerosas hormonas y adipoquinas (citoquinas segregadas por el tejido adiposo) como leptina, interleucina-6, resistina, grelina y adiponectina^{1, 5}.

1.3 Activación farmacológica de AMPK

Dada su gran importancia reguladora en tantos procesos metabólicos básicos así como en numerosas enfermedades, AMPK se revela como una diana terapéutica especialmente potente para el tratamiento de este tipo de patologías. Por tanto, desde su descubrimiento se han sucedido las aportaciones de compuestos que actúan como activadores de AMPK, la mayoría de los cuales provenientes de cribado de alto rendimiento de grandes colecciones de compuestos o bien de muestras de origen natural, si bien en muchos casos estudios basados en el mecanismo de acción de los moduladores o en el diseño racional de fármacos es el paso principal para obtener un prototipo con mayor eficacia, especificidad y estabilidad^{2, 19-20}.

No se conocen muchos inhibidores de AMPK²¹. El primero en ser identificado es el denominado “compuesto C”²¹⁻²² (**figura 1.6**), resultado de un HTS basado en la actividad *in vitro* sobre AMPK²³, pero que ha resultado ser altamente promiscuo en otras quinasas²⁴. Partiendo de este compuesto se han realizado aproximaciones al diseño racional de nuevos inhibidores²⁵.

Pero es en el campo de los activadores de AMPK donde se han realizado los avances más significativos. De manera general, los activadores de AMPK se pueden clasificar en dos grupos: los que actúan uniéndose directamente a AMPK y los que deben su acción a su intervención a otros niveles. Los primeros se denominan activadores directos, y los segundos, indirectos. Cada activador de AMPK al ser ensayado provoca respuestas metabólicas y fisiológicas diferentes que afectan a distintas rutas metabólicas, sistemas o tejidos, debido a una particular especificidad o mecanismo de acción. En muchos casos, el mecanismo concreto de acción es desconocido o está siendo explorado. Por otro lado, los ensayos empleados para validar el potencial de cada familia de compuestos son diferentes, con lo que muchos de ellos han

demostrado su eficacia a través de evidencias diferentes, que van desde ensayos de activación de enzimas fosforiladas por AMPK, como ACC, hasta la medida de la concentración de productos metabólicos de rutas en las que interviene AMPK, como la lipogénesis *de novo*.

Mientras que los activadores indirectos de AMPK son un campo de trabajo recurrente, habiendo llegado muchos a ser ya usados como fármacos por sus efectos metabólicos, los pocos activadores directos que se han descrito no han llegado a alcanzar el mercado, lo que deja opciones abiertas para la investigación en nuevos compuestos capaces de unirse directamente a AMPK. Por otro lado, la mayoría de activadores directos presentan poca o ninguna especificidad por una isoforma en concreto, lo cual sería una propiedad muy interesante a desarrollar, ya que cada combinación de isoformas presenta funciones y localizaciones distintas. Con la cantidad de información estructural disponible, el diseño computacional de fármacos ofrece muchas oportunidades de llevar a cabo nuevas propuestas de unión a AMPK que alcancen esta especificidad de sustrato²⁶.

1.3.1. Activadores indirectos

Como se ha comentado, son activadores indirectos de AMPK aquellos que no deben su acción a una interacción directa con AMPK. Esto puede significar una actividad a muy diversos niveles: regular la activación alostérica mediada por AMP y ADP, como algunos derivados de tiazolidinedionas (TZDs); activación de quinasas que fosforilan AMPK, caso de metformina, resveratrol o curcumina; desactivación de las fosfatasas específicas de AMPK; provocación de cambios conformacionales de cualquier tipo sin interacción directa o modificación de la relación de concentraciones $[AMP]/[ATP]$, caso de berberina².

La mayoría de los activadores indirectos descritos provienen de fuentes naturales, y ya se usan en el tratamiento de enfermedades o situaciones patológicas generalmente relacionadas con el metabolismo, como la hiperglicemia o la diabetes. La estructura de todos ellos se recoge en la **figura 1.6**.

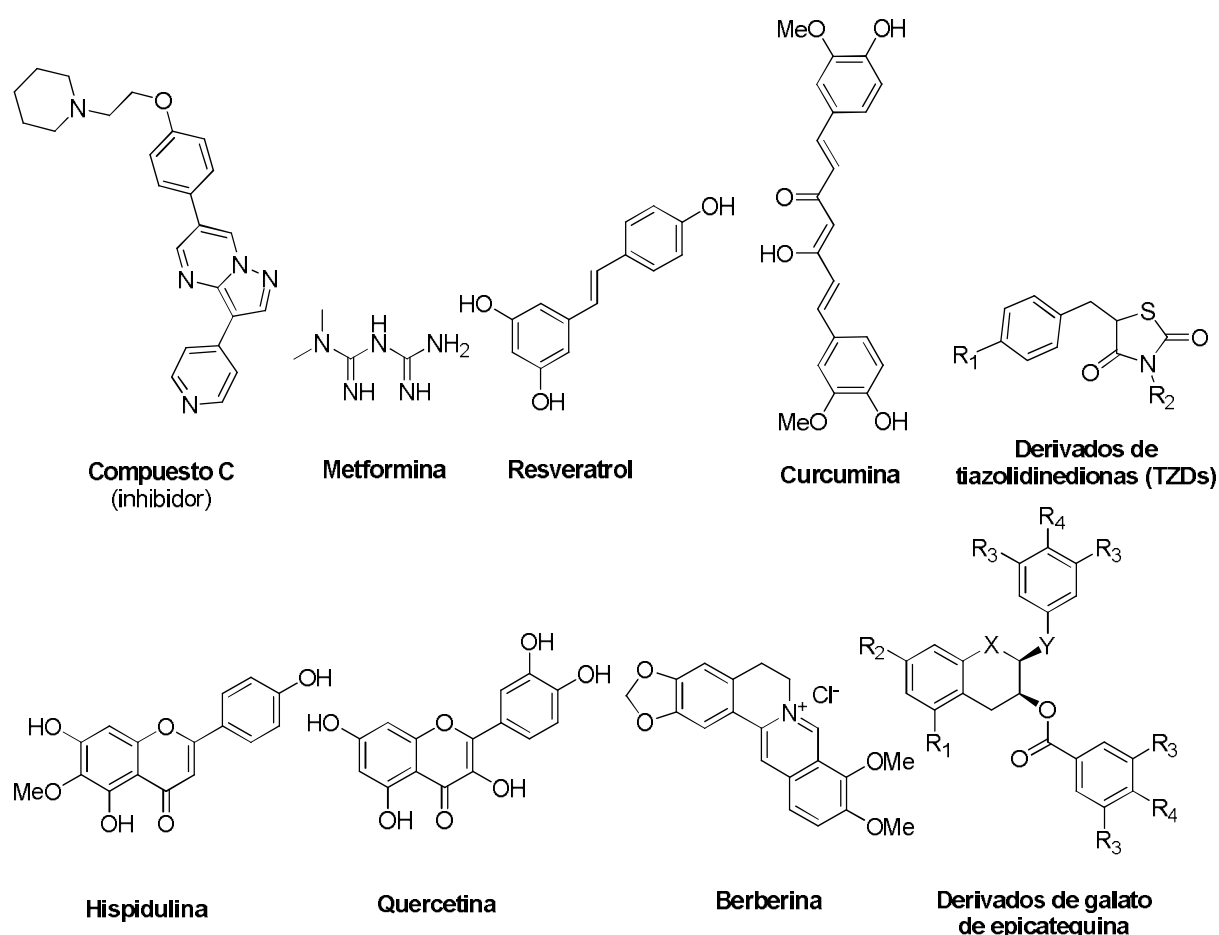


Figura 1.6. Compuesto C, inhibidor de AMPK, y activadores indirectos de AMPK de origen natural.

Metformina

La metformina es un fármaco comercializado para diabetes. Es un derivado de biguanida de la guanidina. Se usa como agente anti-hiperglicémico en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (T2D, *Type 2 Diabetes*). Actúa suprimiendo la producción hepática de glucosa. Inhibe la cadena respiratoria mitocondrial²⁷. El mecanismo por el cual lleva a cabo estos efectos no está del todo claro²⁸. Actualmente se usa además para validar otros efectos terapéuticos de AMPK.

Resveratrol

El resveratrol es un estilbeno polihidroxi-sustituido que se encuentra en varias fuentes naturales, entre ellas la piel de la uva. Provoca un incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, lo que activa la quinasa $\text{CaMKK}\beta$, una de las enzimas que catalizan la fosforilación activante de Thr-172, si bien estos resultados están pendientes de confirmación²⁹.

Partiendo de la estructura del resveratrol, Vingtdeaux y col. llevaron a cabo el cribado de una quimioteca de 158 compuestos, encontrando análogos que también interaccionan con CaMKK β ³⁰.

Otros activadores indirectos de origen natural

En la **figura 1.6** se recoge la estructura de los otros principales activadores indirectos de AMPK de origen natural. Como se puede observar, su naturaleza química es muy variada, así como su origen, aunque destacan los metabolitos secundarios vegetales. La propiedad activadora de AMPK de la mayoría de ellos se estableció a partir de estudios de cribado *in vitro*.

Una familia importante en este grupo de activadores indirectos de origen natural lo ocupan los flavonoides, a la que pertenecen moléculas como la quercetina (muy común en frutas y verduras), la dihidrochalcona (rizomas usados como complementos dietéticos) o la hispidulina. Otras familias con representantes importantes son los alcaloides (berberina y derivados) y los polifenoles (galatos de 3-epigallocatequina, EGCG, y derivados; curcumina y derivados). La importancia de estos compuestos se debe en parte a que en muchas ocasiones constituyen el punto de partida para el diseño de fármacos sintéticos mediante la optimización estructural de las funcionalidades químicas presentes.

Otros activadores indirectos de origen sintético

La **figura 1.7** muestra la estructura de los principales activadores indirectos de AMPK de origen sintético. El origen de estos compuestos también son cribados de alto rendimiento sobre amplias quimiotecas, o bien el resultado de una posterior optimización estructural de los prototipos².

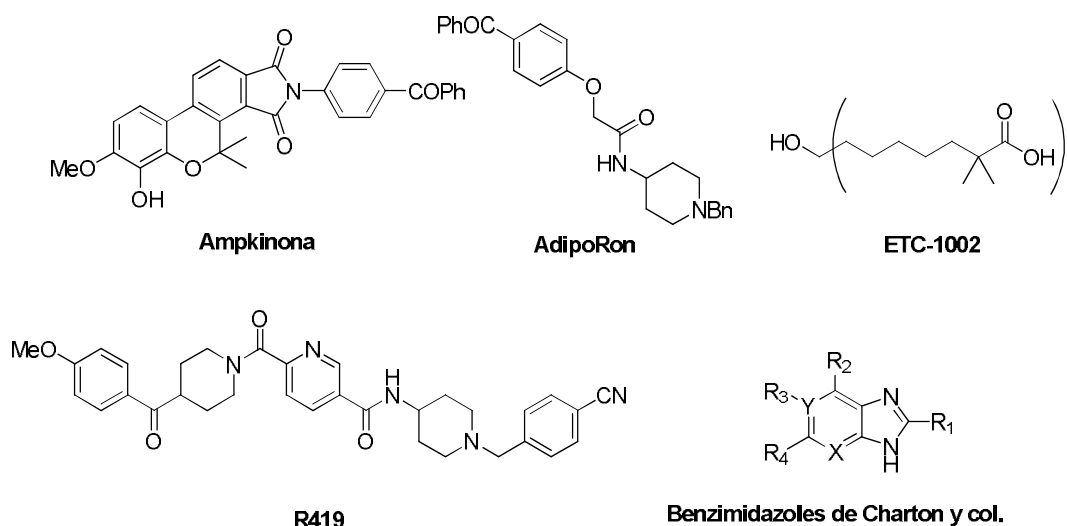


Figura 1.7. Activadores indirectos de origen sintético.

1.3.2. Activadores directos.

AICAR y otros miméticos de AMP.

AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida ribosa, **figura 1.8**) fue aislado en 1956 por Goldthwait y col. de un cultivo de *E. coli*³¹. Es un precursor de la adenosina, y un análogo de la misma. Se fosforila en el citoplasma celular por la adenosina quinasa para generar ZMP (5-aminoimidazol-4-carboxamida dinucleótido, **figura 1.8**). Este último compuesto es el responsable de la actividad, que estimula AMPK en humanos y ratas hasta lograr un incremento de K_m 20 veces mayor que el activador endógeno AMP. Se sabe que ZMP se une al CBS 1 y/o al 3 de la subunidad γ (ver **sección 1.1**) y por tanto compite por los mismos sitios de unión con AMP.

AICAR ha sido objeto de numerosos estudios de relación estructura actividad (SAR) que han esclarecido su mecanismo de acción. Así, se sabe que los grupos adenina y monofosfato son importantes, y su sustitución o modificación anula o disminuye la actividad del fármaco, mientras que la ribosa no es crucial. El tratamiento con AICAR fomenta la fosforilación de Thr-172 en el bucle de activación. Afecta principalmente a las rutas del metabolismo de glúcidos y lípidos, pero también disminuye la proliferación de células cancerosas. En este sentido, se ha demostrado que en las células tratadas con AICAR aumenta la fosforilación de p53, un regulador del ciclo celular que es diana de AMPK, y esto provoca la detención del ciclo celular en la fase S³².

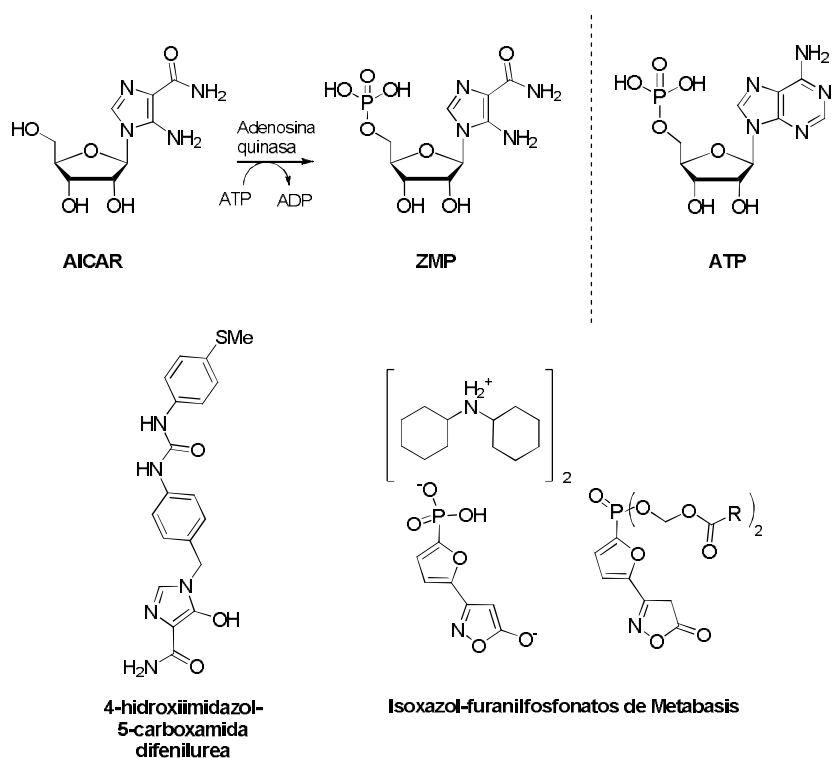


Figura 1.8. Estructura de AICAR, ZMP y comparación con AMP y con la difenilurea de Merck.

Compuestos relacionados con AICAR han sido reportados por Merck. Entre ellos, una 4-hidroxiimidazol-5-carboxamida difenilurea (**figura 1.8**), que muestra un incremento en más del 310 % de la actividad basal de la enzima a $200 \mu\text{M}^{33}$.

Por su parte, *Metabasis Therapeutics* realizó el cribado de una quimioteca de unos 1.200 miméticos de AMP relacionados con AICAR, descubriendo el furanil-fosfonato diciclohexilamonio mostrado en la **figura 1.14**, un potente y selectivo activador de AMPK con $\text{EC}_{50} = 6.3 \text{ nM}$. Para contrarrestar su pobre permeabilidad celular se diseñaron varios profármacos sensibles a esterasas con valores nanomolares de EC_{50} , apareciendo derivados fosforados de segunda generación³⁴ que mantienen el motivo isoxazol-furil-fosfonato. Un ejemplo se muestra también en la **figura 1.14**.

Familia de las tienopiridonas. Prototipos de Abbott y de Merck.

La investigación alrededor de esta familia de compuestos comenzó con Cool y col., de Laboratorios Abbott, que después de un HTS de una librería de unos 700.000 compuestos

llegaron al prototipo A-592107³⁵ (**figura 1.9**) como activador directo de AMPK. La optimización posterior llevó a A-769662 (**figura 1.9**), $EC_{50} = 0.8 \mu M$.

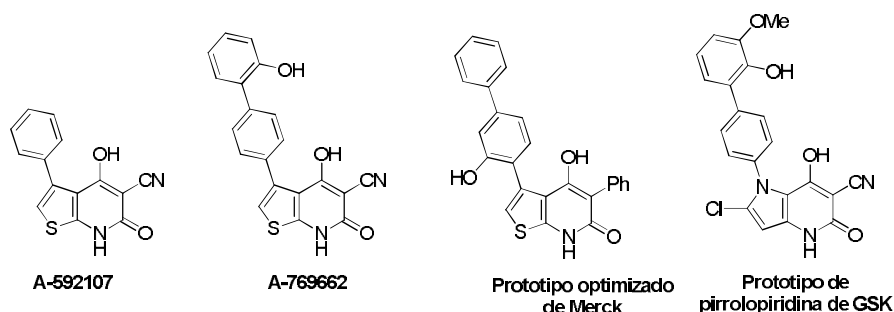


Figura 1.9. Tienopiridonas A-592107 y A-769662 de Abbott y prototipo de tienopiridona de Merck y pirrolopiridina de GSK.

Los estudios *in vitro* demostraron que el mecanismo de acción era diferente al de AMP y AICAR: A-769662 activa AMPK mediante la inhibición de la defosforilación de p-Thr-172.

Otro dato muy interesante de este compuesto es que, como se ha puesto de manifiesto mediante exhaustivos estudios de mutación³⁶, activa selectivamente sólo aquellos heterotrímeros que contengan la isoforma $\beta 1$.

La resolución de la estructura completa de $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ unida a A-769662 por Xiao y col.³⁷⁻³⁸ demuestra que se aloja en una hendidura localizada en la interfaz entre el dominio quinasa N-terminal de la subunidad α y el módulo de unión a carbohidratos (CBM) de la subunidad β (**figura 1.1**). Las interacciones que se establecen se muestran en la **figura 1.10**. Al unirse, estabiliza la conformación de AMPK que es resistente a la defosforilación de Thr-172 (ver sección 2.1).

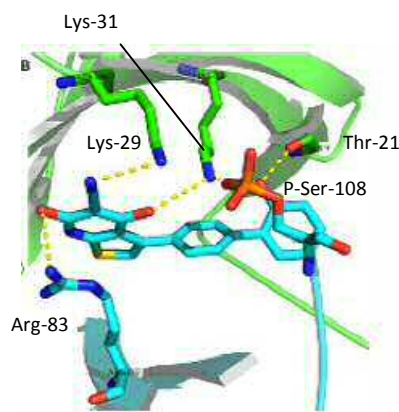


Figura 1.10. Esquema del acoplamiento de A-769662 en $\alpha 2\beta 1\gamma 1$, con representación de las interacciones polares estabilizantes. Los residuos representados en verde pertenecen al dominio quinaso, y los representados en azul, al CBM. Tomado de Rana *et al.*, 2015 y Xiao *et al.*, 2013.

Retomando el trabajo de Abbot, Merck identificó las tienopiridonas como estructuras privilegiadas para la activación directa AMPK en el tratamiento de diabetes, síndrome metabólico y obesidad³⁹. Como resultado de las evaluaciones realizadas, Merck desarrolló el prototipo optimizado de la **figura 1.9**, que aumentaba la actividad basal de AMPK más de un 625 % a 30 μM ⁴⁰.

Con la disponibilidad de las estructuras cristalinas y los datos SAR disponibles, el núcleo de tienopiridona se presenta como un punto de partida viable para la optimización estructural de activadores de AMPK.

Familia de las pirrolopiridinas

Volviendo al prototipo de Abbott A-769662, GlaxoSmithKline (GSK) llevó a cabo una mejora de la absorción oral y del perfil de selectividad. Mediante la sustitución bioisótera del anillo de tiofeno por un pirrol se llega a una estructura de pirrolo[3,2-*b*]piridina-5(4*H*)-ona, con mejor disponibilidad oral pero mayor velocidad de desaparición en plasma⁴¹ (**figura 1.9**). Quedaba inaugurada así una nueva familia de activadores directos de AMPK que además mejoraba las propiedades farmacocinéticas de las tienopiridonas.

Los SAR posteriores revelaron que la presencia del grupo ciano en posición 3 de las pirrolopiridinas se asocia con una pobre permeabilidad, debido a la naturaleza ácida del anillo

de cianopiridona. El reemplazo del grupo ciano por uno fenilo mejora la permeabilidad y la biodisponibilidad oral.

La pirrolopiridina de la **figura 1.9**, como sucedía con A-769662, también presenta interesantes propiedades de selectividad, pues activa sólo siete de las 12 isoformas posibles: $\alpha 1\beta 1\gamma(1,2,3)$, $\alpha 2\beta 1\gamma 1$, $\alpha 1\beta 2\gamma 1$, $\alpha 2\beta 2\gamma(1,3)$, con pEC_{200} en el rango μM .

Familia de los benzimidazoles

En los últimos años, Merck ha publicado varias patentes reivindicando la familia de los benzimidazoles como terapéuticamente relevantes en el tratamiento, prevención y supresión de enfermedades vía activación de AMPK⁴²⁻⁴⁶. El trabajo de Xiao y col.³⁷ reporta la estructura cristalina del complejo formado por el heterotrímero $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ y el 6-cloro-benzoimidazol de la **figura 1.11**. Se demuestra que esta familia se une a la misma zona que las tienopiridonas, la interfaz entre el dominio quinasa de la subunidad α y el CBM de la subunidad β , y activa preferentemente los heterotrímeros que contienen la isoforma $\beta 1$. Las EC_{50} de esta familia de compuestos están en el rango nM, con algunos ejemplos en el rango sub-nM, y con otros que generan niveles de activación superiores al 600 % respecto a los basales (**figura 1.11**).

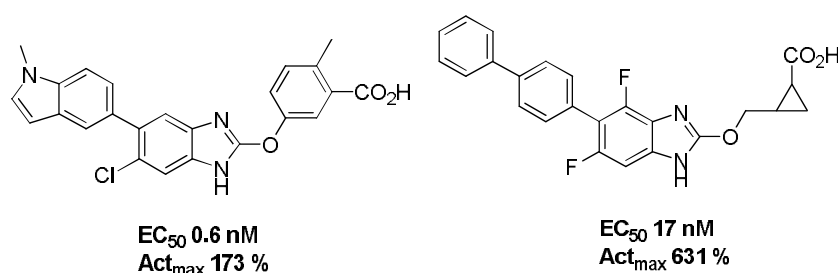


Figura 1.11. Ejemplos representativos de benzimidazoles de Merck.

PT1 y la familia de los oxoindoles.

Usando una forma inactiva del dominio catalítico, obtenida a partir de un truncamiento de la subunidad α , Pang y col. cribaron una quimioteca de unos 3.600 compuestos. Esto llevó al

descubrimiento de un activador derivado de oxotiazol con EC_{50} alrededor de $8 \mu M$ al que se dio el nombre de PT1⁴⁷ (**figura 1.12**).

PT1 no activa AMPK si se les ha eliminado la secuencia autoinhibitoria, lo que induce a pensar que interacciona sólo con esta secuencia localizada en la subunidad α , al contrario que otros moduladores alostéricos como A-769662. Por otro lado, PT1 es selectivo de AMPK, ya que no muestra interacción con otras protein-quinasas. En todo caso, su mecanismo necesita ser confirmado y aclarado²¹.

Debido a su pobre biodisponibilidad e insuficiente potencia, PT1 es inactivo *in vivo*⁴⁸. La optimización estructural llevada a cabo por Li y col.⁴⁹ para solucionar este problema condujo al descubrimiento de la familia de los oxoindoles, y en especial los alquenooxoindoles (**figura 1.12**) y algunos bioisómeros, familia con ventajas farmacocinéticas respecto a PT1 y especial potencial en la activación de AMPK. Esta familia fue ampliada en las reivindicaciones de F. Hoffmann – La Roche AG para el tratamiento de obesidad inducida por la dieta y diabetes tipo 2⁵⁰⁻⁵².

En la familia de los oxoindoles destaca también *Sunitinib*, un fármaco cuya eficacia *in vivo* fue puesta de manifiesto en 2003 y que actualmente es usado como primera opción en el tratamiento de varios tipos de tumores. Actúa inhibiendo receptores de varios factores de crecimiento celular que participan en la angiogénesis del tumor⁵³⁻⁵⁴. Actúa como inhibidor indirecto de AMPK⁵⁵, posiblemente a través de esta vía (**figura 1.12**).

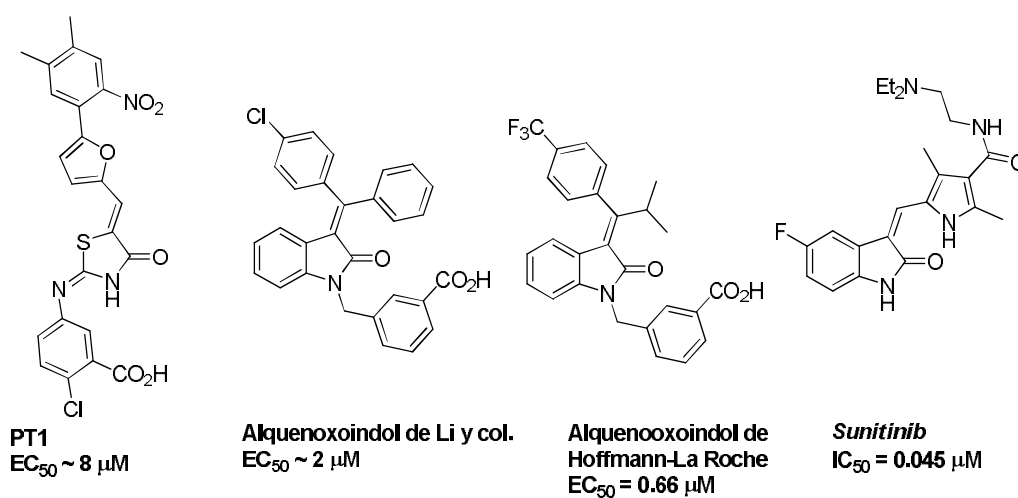


Figura 1.12. Estructura de PT1 y ejemplos significativos de la familia de alquenooxoindoles.

Otros activadores directos.

Mercury Therapeutics reportó en 2009 la síntesis y el cribado de compuestos derivados de hidroxibifenilos como moduladores de AMPK con valores de ED_{50} inferiores a $10\ \mu\text{M}$ para el tratamiento de cáncer, diabetes y enfermedades neurológicas⁵⁶. Las estructuras de los principales representantes se muestran en la **figura 1.13**. Se observa que todos ellos tienen en común la presencia de un grupo ciano en relación 1, 3 con un nitrógeno heterocíclico.

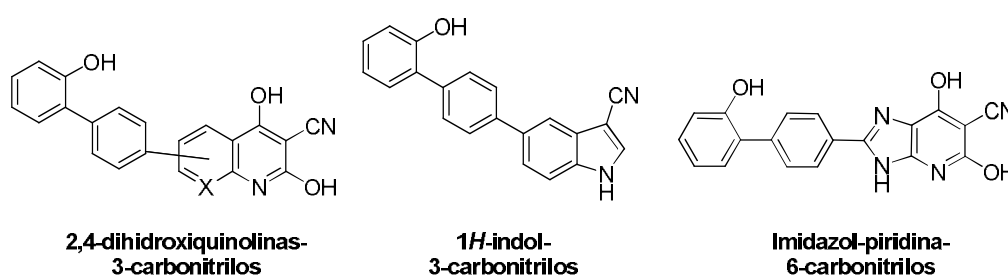


Figura 1.13. Estructura de los hidroxibifenilos descritos por Mercury.

La familia de tetrahidroquinolinas (**figura 1.14**) también presenta propiedades activadoras de AMPK, y fueron incluidas en la patente de F. Hoffmann-La Roche que contenía los alquenooxindoles.

El salicilato también ha mostrado capacidad de activación de AMPK sin modificar la relación de concentraciones de AMP y ATP. Bajo concentraciones fisiológicas de ATP, el salicilato provoca un incremento de la actividad de la enzima 1.6 veces mayor que su actividad basal, con un efecto a la mitad del máximo en torno a $1.0\ \text{mM}$. Ensayos *in vivo* han puesto de manifiesto que el salicilato fosforila AMPK en el sóleo, el tejido adiposo y el hígado. Gran parte de su interés se debe a que se une al mismo sitio alostérico que A-769662 (**figura 1.1**) y también es selectivo de la isoforma $\beta 1$ ⁵⁷⁻⁵⁸.

Por último, Choi y col. identificaron la sanguinarina, un alcaloide de benzofenantridina, en un cribado de una quimioteca de unos 1.200 compuestos. Este alcaloide tiene interesantes propiedades de selectividad, pues activa sólo aquellos heterotrímeros que contienen simultáneamente las isoformas $\alpha 1$ y $\gamma 1$. No obstante, es entre 5 y 10 veces menos potente que AMP⁵⁹.

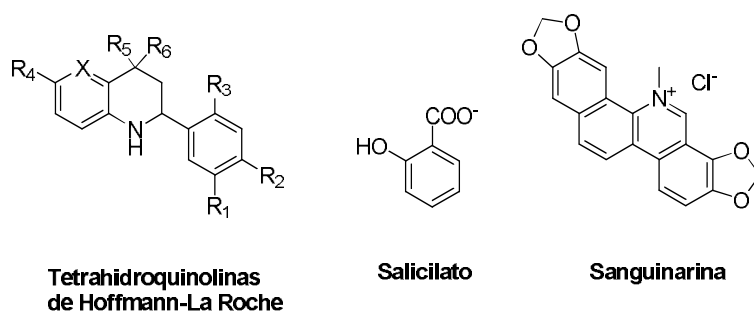


Figura 1.14. Tetrahydroquinolinas de Hoffmann-La Roche y los activadores naturales salicilato y sanguinarina.

1.4 AMPK como diana farmacológica.

Debido a su importancia, cualquier alteración en el correcto funcionamiento de AMPK está asociada con numerosas patologías¹ (**figura 1.15**). En primer lugar, puesto que AMPK se encarga del mantenimiento de los niveles óptimos de la relación de concentraciones AMP/ATP, está relacionada con enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2, la obesidad, ciertas alteraciones cardíacas, especialmente de tipo hipertrófico, debido a la considerable magnitud de las transferencias energéticas en este tejido, y todas las alteraciones que quedan agrupadas bajo la denominación de síndrome metabólico. En segundo lugar, su participación en los ciclos, crecimiento y proliferación celular la relaciona con muchos tipos de cáncer. En tercer lugar tiene importantes papeles en la neurodegeneración y la salud del tejido neuronal, debido a que las células nerviosas son las que tienen menor capacidad de almacenamiento energético, pero sin embargo las que más energía consumen¹. Esta lista está en continuo crecimiento, y los recientes descubrimientos dan cuenta del gran alcance de AMPK, dada su participación en otros muchos procesos tan diversos como la respuesta inflamatoria de los tejidos, la agregación plaquetaria o procesos hormonales y de señalización⁷.

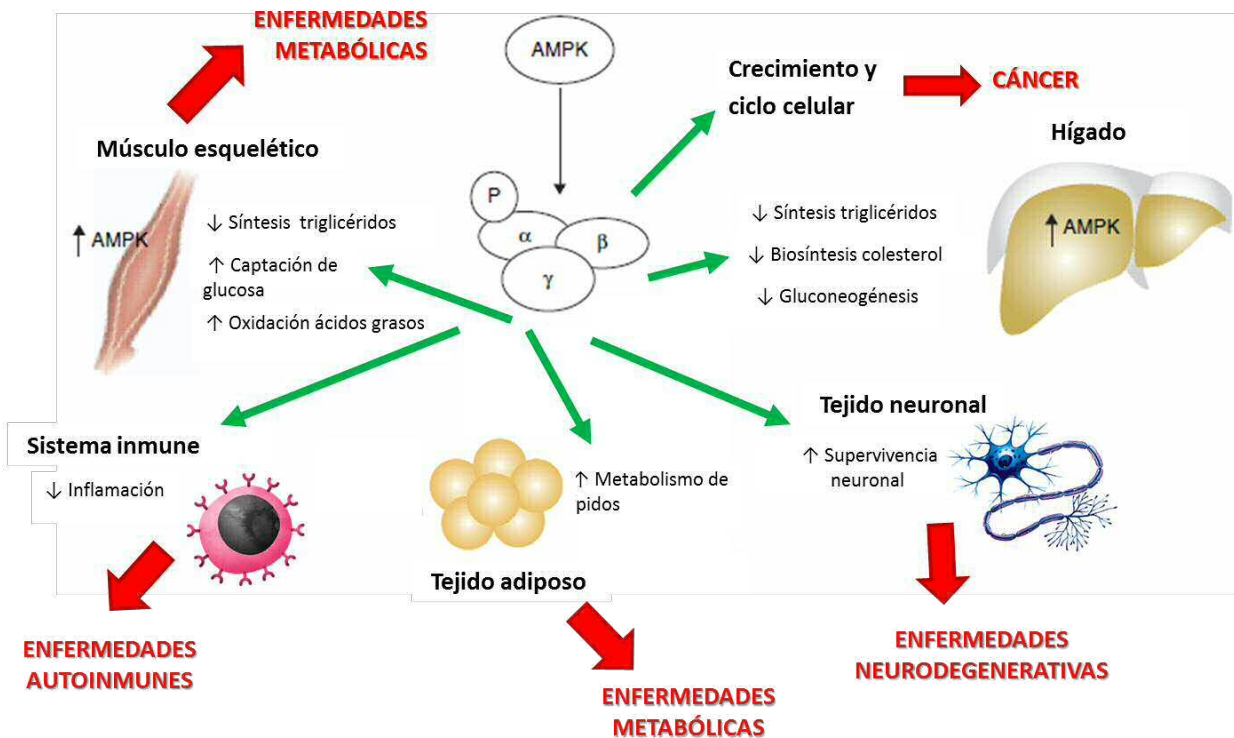


Figura 1.15. Esquema de relación entre las funciones de AMPK y su utilidad en condiciones patológicas. Este esquema está actualmente enriqueciéndose completándose continuamente.

Este conjunto de patologías ocupan actualmente un lugar preminente entre las principales causas de muerte en países desarrollados, y en muchos casos son consecuencia directa de los estilos de vida actuales, de ahí que constituyan uno de los principales desafíos de la ciencia médica en nuestros días y la importancia del descubrimiento de estrategias terapéuticas novedosas, entre las cuales AMPK aparece como una diana potente y prometedora.

1.4.1 AMPK y enfermedades metabólicas

La diabetes tipo 2 se produce cuando una liberación anormalmente alta de insulina en las células β del páncreas no puede compensar la resistencia de las células a la propia insulina. Esta resistencia se asocia con una alta concentración de di- y triacilglicerol, por lo que es mucho más frecuente en pacientes obesos y está asociada a la falta de ejercicio físico. Esto explica que sea especialmente incidente en países desarrollados y en vías de desarrollo. Representa el 90% de los casos totales de diabetes. Su nivel de incidencia es cada vez mayor, llegando actualmente a alcanzar cotas de auténtica epidemia: según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2012 fallecieron 1,5 millones de personas como consecuencia directa de

la diabetes, en 2014 la prevalencia mundial de la diabetes fue del 9% entre los adultos, y será la séptima causa de mortalidad en 2030 ⁶⁰ (figura 1.16).

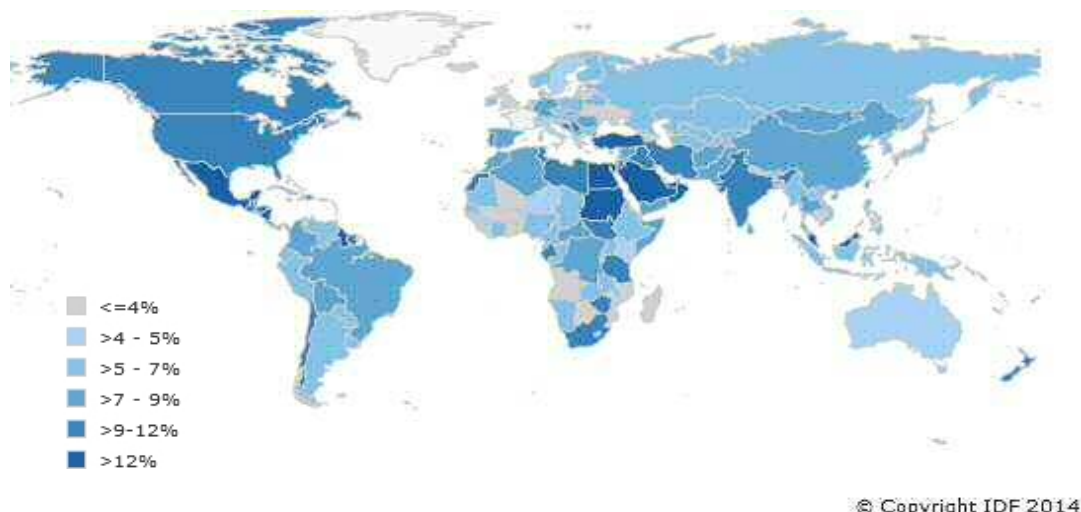


Figura 1.16. Incidencia mundial de la diabetes. Fuente: *International Diabetes Federation* (IDF): <http://www.idf.org/atlasmap/atlasmap>.

Por su parte, la obesidad y el sobrepeso son diferentes niveles de una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Según datos de la OMS, desde 1980 la obesidad ha superado el doble de pacientes en todo el mundo. En 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos. El 39% de las personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso, y el 13% eran obesos. La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos y un descenso en la actividad física como resultado de la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de trabajo, del estilo actual de vida y de una creciente urbanización³¹. Estamos por tanto, como se ha dicho, ante trastornos propios de la época contemporánea.

Por último, muy relacionado con lo anterior, la denominación “síndrome metabólico” agrupa un conjunto de situaciones fisiológicas o factores de riesgo que incrementan la predisposición a sufrir diabetes o cualquier complicación relacionada con el sobrepeso y la obesidad.

La activación de AMPK es una estrategia terapéutica que genera grandes expectativas para el tratamiento de todas estas alteraciones ya que su función biológica es incrementar la

consumición de los excedentes energéticos, efectos similares a los que puede tener la privación de nutrientes o el ejercicio físico. La consumición de las reservas de grasas y acilglicerol es el tratamiento contra el sobrepeso y todas sus complicaciones, incluidas la diabetes y en general el síndrome metabólico. Este tratamiento se articula a través de una cuádruple vía: en primer lugar, favoreciendo la oxidación de los ácidos grasos, lo cual disminuye la acumulación de acilglicerol; en segundo lugar, a través de sus efectos anti-inflamatorios; en tercer lugar, inhibiendo la biosíntesis de proteínas; y en cuarto lugar, a través de su capacidad para reducir el apetito mediado por determinadas hormonas y citoquinas, como se ha comentado. Por otro lado, otros efectos de la activación de AMPK deberían reducir el almacenamiento de lípidos en el hígado y el músculo esquelético, y con ello mejorar la sensibilidad a la insulina: el aumento de captación de glucosa en músculo esquelético y la inhibición de gluconeogénesis en el hígado⁶¹⁻⁶³.

Muchos de estos efectos ya han sido descritos *in vivo* con agentes farmacológicos que activan AMPK, como A-769662³⁵, el producto natural berberina⁶⁴, la fenformina o su análogo metformina (**figura 1.17**). Este último es precisamente el fármaco más usado para el tratamiento de la T2DM, y activa AMPK indirectamente, inhibiendo la cadena respiratoria mitocondrial²⁷, y se ha demostrado que actúa a través de AMPK mediante experimentos de *knock-out* en ratones⁶⁵. En el caso de AICAR, un profármaco activador de AMPK, hay evidencias de que presenta actividad antidiabética, pero independientes de AMPK⁶⁶⁻⁶⁷.

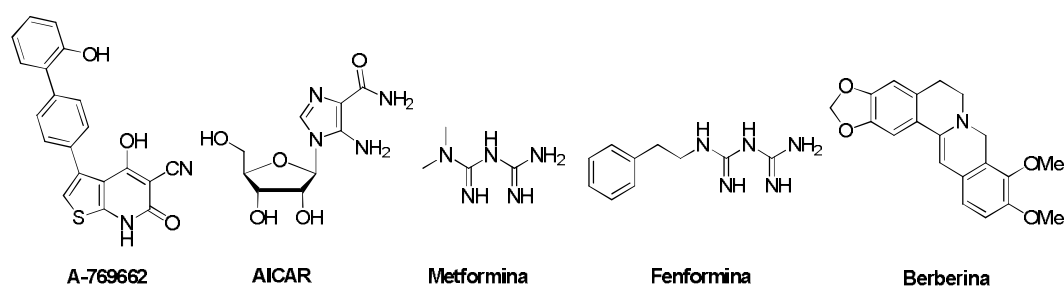


Figura 1.17. Activadores de AMPK con potencial terapéutico contra T2DM demostrado *in vivo*.

Aunque los mecanismos aún no están claros, alteraciones en AMPK pueden ser el enlace entre la obesidad y las complicaciones vasculares que la acompañan. Existen estudios que muestran que en los pacientes de obesidad, tanto animales como humanos, AMPK está dañada en varios tejidos, incluyendo vasos sanguíneos. Esto convierte a AMPK en una diana crítica en el

tratamiento de estas complicaciones vasculares. De hecho, la importancia de AMPK en la función vascular se pone de relieve en la protección que ejercen fármacos usados en el tratamiento de desórdenes metabólicos, como la metformina o las tiazolidindionas, las cuales actúan en parte a través de la activación de AMPK vascular⁶⁸.

1.4.2 AMPK y cáncer

La OMS, a través de su Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), establece que si la diabetes tiene previsión de ser la séptima causa de muerte en el mundo, el cáncer es hoy día la segunda, sólo detrás de las enfermedades cardiovasculares, y aunque la medicina moderna ha conseguido mejorar la esperanza de vida de la mayoría de pacientes de cáncer, se cree que en el siglo XXI será la primera causa de muerte en el mundo desarrollado⁶⁹. Por tanto, la lucha contra el cáncer es también uno de los objetivos prioritarios de la investigación farmacológica, y uno de los más poderosos medios con los que contamos para contribuir a la mejora de la esperanza y la calidad de vida global.

La primera relación de AMPK y el cáncer surgió gracias a los trabajos de Hawley, Woods y Shaw entre 2003–2004⁷⁰⁻⁷², que reportaron que la proteína LKB1 era una de las que mediaban la activación de AMPK. Las mutaciones en el gen que codifica LKB1 provocan el síndrome de Petz-Jeghers, que se caracteriza por el desarrollo de tumores benignos en el intestino (pólipos) y un riesgo incrementado de desarrollar cánceres malignos⁷³⁻⁷⁴. La activación de LKB1 es por tanto una estrategia terapéutica clásica para tratamientos supresores de tumores, surgiendo entonces la cuestión de si esta actividad está mediada por AMPK. Aunque LKB1 fosforila y activa una familia de unas 12 proteínas relacionadas entre sí, de todas ellas AMPK es el mejor candidato para intervenir en el mecanismo supresor de tumores debido a su capacidad para inhibir casi todas las rutas biosintéticas requeridas para el crecimiento celular y para provocar la detención del ciclo celular⁷.

Actualmente no hay consenso acerca del papel de AMPK en cáncer. Se sabe que las células de rápida proliferación, incluyendo las células cancerosas y también las células inmunes involucradas en inflamación tienden a utilizar la captación rápida de glucosa y la glicolisis aerobia antes que el metabolismo oxidativo para satisfacer sus altas demandas de ATP. AMPK tiende a promover el metabolismo oxidativo, que es energéticamente más eficiente, por lo que es de esperar que los fármacos que activan AMPK puedan inhibir la proliferación celular y

por tanto el cáncer^{7, 75-77}. Así, metformina, fenformina, AICAR y A-769662, activadores todos, han demostrado actividad anticancerígena⁷⁸⁻⁸¹. Por ejemplo, a raíz del descubrimiento de la relación LKB1-AMPK, estudios epidemiológicos pusieron de manifiesto que los pacientes diabéticos tratados con metformina o fenformina mostraban menor incidencia de cánceres⁸²⁻⁸³. Todos estos activadores retrasan la aparición de tumores en ratones propensos al desarrollo de cáncer⁸⁴. Por otro lado, los ratones con la subunidad catalítica $\alpha 1$ de AMPK suprimida aceleran el desarrollo de linfomas⁸⁵.

No obstante, surgen evidencias que cuestionan esta justificación metabólica para la actividad anticancerígena de AMPK. Algunos estudios establecen que AMPK puede estar de alguna forma anulada en las células tumorales y que la activación de esta proteína por estrés, hipoxia o señales oncogénicas sea una estrategia de supervivencia de los tumores^{9, 22, 86}. Dasgupta y col., entre otros, han establecido que AICAR, metformina y otros moduladores de AMPK son altamente inespecíficos e inhiben la proliferación celular por mecanismos independientes de AMPK⁸⁷⁻⁹¹. Por ejemplo, mientras que algunos activadores de AMPK han demostrado gran eficacia inhibiendo el crecimiento de cánceres de próstata⁹², *Sunitinib*, un inhibidor de AMPK, es un fármaco que se emplea actualmente en este tipo de cáncer⁹³.

Como resultado, está claro que se necesita un conocimiento más exhaustivo de las rutas metabólicas en las que AMPK está implicada. Como se ha comentado, AMPK está estrechamente relacionada con proteínas reguladoras del crecimiento celular, como la quinasa B/Akt⁹⁴. En este campo, el desarrollo de nuevos moduladores de AMPK es una herramienta imprescindible para explotar el prometedor potencial anticancerígeno de esta proteína, que puede usarse en el tratamiento de tumores de mama, próstata, endometrio, colon, ovario o melanoma y un largo etcétera⁹⁵⁻⁹⁶.

1.4.3 AMPK y enfermedades inflamatorias

Hay cada vez más evidencias de que AMPK tiene efectos antiinflamatorios, probablemente mediados por su actividad metabólica⁹⁷⁻⁹⁸. Como sucedía con las células tumorales, las células inmunes inactivas utilizan fundamentalmente el metabolismo oxidativo para generar ATP, y una vez activadas, suelen cambiar a la glicolisis aerobia. Este cambio está asociado a una menor activación de AMPK y se inhibe mediante la activación farmacológica de AMPK⁹⁹. Estudios con macrófagos muestran incrementos en la oxidación de ácidos grasos al ser

tratados con el activador A-769662 que no aparecen cuando se les suprime las subunidades $\beta 1$ o $\alpha 1$. Esto puede indicar que la actividad anti-inflamatoria de AMPK es mediada por su efecto de incremento en la oxidación de ácidos grasos¹⁰⁰⁻¹⁰¹.

El ácido salicílico se une al mismo sitio que A-769662, y ambos son activadores selectivos de la subunidad $\beta 1$. Esto puede querer decir que parte de los efectos anti-inflamatorios de los fármacos tipo salicilato, como la aspirina o el salsalato, efectos aún no plenamente conocidos, pueden ser mediados por AMPK^{57, 102}.

1.4.4 AMPK y enfermedades neurodegenerativas

La regulación anormal de AMPK está implicada en varias alteraciones neuronales, incluida Alzheimer, Parkinson, Huntington, ELA e ictus¹⁰³⁻¹⁰⁵. Dada la importancia de las enfermedades neurodegenerativas en nuestra sociedad, cada vez más envejecida, AMPK se revela también como una gran oportunidad para conseguir paliar los estragos de un conjunto de patologías cada vez más extendidas.

La enfermedad más estudiada en su relación con AMPK es la de Alzheimer. Como se ha comentado, AMPK también se activa en respuesta a altos niveles de Ca^{2+} , lo cual contribuye a regular la generación de proteína β -amiloide ($\text{A}\beta$). Por otro lado, AMPK incrementa la fosforilación de la proteína tau tanto directa como indirectamente. Y, en tercer lugar, la activación de la autofagia que produce AMPK favorece la degradación de $\text{A}\beta$. Estos dos tipos de proteínas, $\text{A}\beta$ y tau, se acumulan en las neuronas de pacientes de AD, lo que a la larga provoca la muerte neuronal y la pérdida sináptica que causa la demencia y pérdida de memoria¹⁰⁶.

AMPK tiene específicas funciones en el cerebro frente a la periferia. Estas funciones y las rutas en las que está involucrada también difieren mucho en función de la localización celular (hipotálamo frente a córtex), tipo celular (astrocito frente a neurona) y duración de la exposición. Así, se sabe que pequeños incrementos de activación de AMPK están involucrados en el acondicionamiento a la isquemia y en la supervivencia neuronal, pero una hiperactivación de AMPK durante isquemia puede provocar muerte celular neuronal¹⁰⁷⁻¹⁰⁸.

1.4.5 AMPK y enfermedades vasculares

AMPK también desempeña papeles muy importantes en la interrelación entre el metabolismo y el sistema vascular.

La activación farmacológica de las variedades de AMPK vascular puede ser una pieza clave para disminuir el grosor de la bicapa lipídica interna de los vasos sanguíneos. Esta estrategia puede ser muy interesante, por ejemplo, para abordar la restauración de las funciones vasculares de pacientes obesos⁶⁸.

Por otro lado, a nivel neurovascular AMPK está altamente expresada en neuronas corticales e hipocampales tanto en condiciones normales como isquémicas, y desempeña un papel fundamental en neuroprotección¹⁰⁹. La actividad de AMPK se incrementa tras la oclusión de arterias cerebrales o la privación de glucosa¹⁰⁹. La inhibición farmacológica de AMPK, por ejemplo a través del compuesto C reduce el daño neuronal provocado por el infarto cerebral. Por otro lado, su activación por AICAR incrementa este daño¹¹⁰, e incluso, como se ha dicho, una hiperactivación de AMPK durante isquemia puede provocar muerte celular neuronal¹⁰⁷.

En estudios experimentales, metformina incrementa la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular y la mejora de la densidad microvascular, lo cual puede ser muy útil en la recuperación post-infarto¹¹¹.

También se ha comenzado a estudiar la importancia vascular y neurovascular de AMPK desde la perspectiva del envejecimiento^{4, 112}. Hoy se sabe que los niveles de AMPK fosforilada son mayores en cerebros de ratones viejos, y que la activación de AMPK inducida por obstrucción vascular está más atenuada en estos casos¹¹³.

1.5 Objetivos Generales

La intensa labor de investigación desarrollada, tanto en el ámbito académico como industrial, en torno al mejor conocimiento de AMPK a lo largo de estos últimos años, ponen en relieve que AMPK es una proteína con una importancia única como diana farmacológica. No obstante, aún queda mucho por hacer. AMPK sigue siendo globalmente una proteína muy desconocida. Prueba de ello son los importantes interrogantes que sigue planteando entre la comunidad científica, que abarcan por ejemplo su papel y su utilidad en la aparición y el desarrollo de tumores, en la respuesta inflamatoria o en la supervivencia neuronal. Asuntos todos ellos que se presentan como cruciales en el posible avance en la lucha contra muchas enfermedades que hoy día afectan a buena parte de la población mundial.

Esta es la razón por la que el estudio de AMPK cobra tanta importancia. La presente Memoria pretende contribuir a este estudio desde el campo de la química médica. La síntesis y evaluación como moduladores de AMPK de nuevas familias de moléculas es el primer paso, y uno de los decisivos, en el proceso no sólo de descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de todas estas enfermedades, sino para suministrar información útil que permita conocer más a fondo esta proteína y estar más cerca de explotar un potencial farmacológico.

En los capítulos posteriores se expondrá la aproximación realizada al diseño y a la síntesis de nuevos prototipos químicos, así como los ensayos biológicos preliminares a los que se sometieron para evaluar su potencial como posibles agentes farmacológicos.

Estos compuestos están agrupados en tres familias químicas. Dos de ellas, los derivados de quinolonas y de oxoindoles, están inspiradas en prototipos comentados en la sección de activación farmacológica de AMPK, quedan recogidas en los capítulos dos y tres, respectivamente, de la presente Memoria. El objetivo que se persigue es optimizar las estructuras de cara a mejorar su perfil como fármacos, ya sea a través de la optimización de su eficacia o de sus propiedades farmacocinéticas.

El cuarto capítulo supone una innovación respecto a las estructuras ya preparadas, pues unen los dos motivos privilegiados anteriores, piridonas unidos a grupos π -excedentes, por un lado, con oxoindoles, por otro, a través de carbonos espiránicos, estructuras a las que se ha accedido a través de rutas sintéticas multicomponente. La innovación estructural de estos compuestos, como se expondrá, se ha traducido en un comportamiento farmacológico muy llamativo, que por un lado los postula como interesantes prototipos para la activación in vitro

de AMPK, y por otro abre nuevos interrogantes en el campo de la modulación de esta proteína.

El desarrollo de la presente Memoria se ha llevado a cabo en el Instituto de Química Médica del CSIC, donde se ha realizado la parte sintética y de caracterización estructural de los nuevos compuestos, así como la determinación de las propiedades físico-químicas. Como proyecto multidisciplinar, los ensayos de caracterización farmacológica se han llevado a cabo en colaboración con distintos grupos de investigación de reconocido prestigio. En concreto, los estudios de activación en células de AMPK, han sido realizados por el grupo del Prof. Pascual Sanz, del Instituto de Biomedicina del CSIC de Valencia; los ensayos del potencial antiinflamatorio por la Dra. Sara Ballester de la Unidad de Regulación Génica del Instituto de Salud Carlos III; la evaluación del potencial antitumoral por la Prof. Inés Díaz-Laviada de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares; los ensayos de activación de AMPK endotelial por el grupo de la Dra. María Soledad Fernández-Alfonso de la Universidad Complutense de Madrid; los experimentos de RMN para la asignación inequívoca de las estructuras más complejas del capítulo cuatro ha sido posible gracias a Dra. Elisa García y Dra. María Luisa Jimeno, del servicio de RMN del Centro de Química Orgánica Lora Tamayo, y la predicción *in silico* de las propiedades tipo fármaco se deben a Dra. Eva María Priego, del Instituto de Química Médica.

Bibliografía del capítulo 1

1. Krishan, S.; Richardson, D. R.; Sahni, S., Adenosine monophosphate -activated kinase and its key role in catabolism: Structure, regulation, biological activity, and pharmacological activation. *Molecular Pharmacology* **2015**, *87* (3), 363-377.
2. Rana, S.; Blowers, E. C.; Natarajan, A., Small molecule adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase (AMPK) modulators and human diseases. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (1), 2-29.
3. Hardie, D. G.; Ross, F. A.; Hawley, S. A., AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2012**, *13* (4), 251-262.
4. Burkewitz, K.; Zhang, Y.; Mair, W. B., AMPK at the nexus of energetics and aging. *Cell Metabolism* **2014**, *20* (1), 10-25.
5. Novikova, D. S.; Garabadzhiu, A. V.; Melino, G.; Barlev, N. A.; Tribulovich, V. G., AMP-activated protein kinase: Structure, function, and role in pathological processes. *Biochemistry (Moscow)* **2015**, *80* (2), 127-144.
6. Carling, D.; Zammit, V. A.; Hardie, D. G., A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* **1987**, *223* (2), 217-222.
7. Hardie, D. G., AMP-activated protein kinase: A key regulator of energy balance with many roles in human disease. *Journal of Internal Medicine* **2014**, *276* (6), 543-559.
8. Oakhill, J. S.; Scott, J. W.; Kemp, B. E., Structure and function of AMP-activated protein kinase. *Acta Physiologica* **2009**, *196* (1), 3-14.
9. Amodeo, G. A.; Rudolph, M. J.; Tong, L., Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1. *Nature* **2007**, *449* (7161), 492-495.
10. Xiao, B.; Sanders, M. J.; Underwood, E.; Heath, R.; Mayer, F. V.; Carmena, D.; Jing, C.; Walker, P. A.; Eccleston, J. F.; Haire, L. F.; Saiu, P.; Howell, S. A.; Aasland, R.; Martin, S. R.; Carling, D.; Gamblin, S. J., Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* **2011**, *472* (7342), 230-233.

11. Chen, L.; Xin, F. J.; Wang, J.; Hu, J.; Zhang, Y. Y.; Wan, S.; Cao, L. S.; Lu, C.; Li, P.; Yan, S. F.; Neumann, D.; Schlattner, U.; Xia, B.; Wang, Z. X.; Wu, J. W., Conserved regulatory elements in AMPK. *Nature* **2013**, *498* (7453), E8-E10.
12. Ross, F. A.; Jensen, T. E.; Hardie, D. G., Differential regulation by AMP and ADP of AMPK complexes containing different γ subunit isoforms. *Biochemical Journal* **2016**, *473* (2), 189-199.
13. Hardie, D. G.; Schaffer, B. E.; Brunet, A., AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26* (3), 190-201.
14. Scott, J. W.; Hawley, S. A.; Green, K. A.; Anis, M.; Stewart, G.; Scullion, G. A.; Norman, D. G.; Hardie, D. G., CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *Journal of Clinical Investigation* **2004**, *113* (2), 274-284.
15. Ruiz, A.; Xu, X.; Carlson, M., Ptc1 protein phosphatase 2C contributes to glucose regulation of SNF1/AMP-activated protein kinase (AMPK) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288* (43), 31052-31058.
16. Li, X.; Wang, L.; Zhou, X. E.; Ke, J.; De Waal, P. W.; Gu, X.; Tan, M. H. E.; Wang, D.; Wu, D.; Xu, H. E.; Melcher, K., Structural basis of AMPK regulation by adenine nucleotides and glycogen. *Cell Res.* **2015**, *25* (1), 50-66.
17. Hudson, E. R.; Pan, D. A.; James, J.; Lucocq, J. M.; Hawley, S. A.; Green, K. A.; Baba, O.; Terashima, T.; Hardie, D. G., A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Current Biology* **2003**, *13* (10), 861-866.
18. Polekhina, G.; Gupta, A.; Michell, B. J.; Van Denderen, B.; Murthy, S.; Feil, S. C.; Jennings, I. G.; Campbell, D. J.; Witters, L. A.; Parker, M. W.; Kemp, B. E.; Stapleton, D., AMPK β subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr. Biol.* **2003**, *13* (10), 867-871.
19. Kim, J.; Shin, J.; Ha, J., Screening methods for AMP-activated protein kinase modulators: A patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2015**, *25* (3), 261-277.
20. Yun, H.; Ha, J., AMP-activated protein kinase modulators: A patent review (2006 - 2010). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2011**, *21* (7), 983-1005.

21. Miglianico, M.; Nicolaes, G. A. F.; Neumann, D., Pharmacological Targeting of AMP-Activated Protein Kinase and Opportunities for Computer-Aided Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 59 (7), 2879-2893.
22. Chuang, H. C.; Chou, C. C.; Kulp, S. K.; Chen, C. S., AMPK as a potential anticancer target - friend or foe? *Current Pharmaceutical Design* **2014**, 20 (15), 2607-2618.
23. Zhou, G.; Myers, R.; Li, Y.; Chen, Y.; Shen, X.; Fenyk-Melody, J.; Wu, M.; Ventre, J.; Doebber, T.; Fujii, N.; Musi, N.; Hirshman, M. F.; Goodyear, L. J.; Moller, D. E., Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Journal of Clinical Investigation* **2001**, 108 (8), 1167-1174.
24. Bain, J.; Plater, L.; Elliott, M.; Shpiro, N.; Hastie, C. J.; McLauchlan, H.; Klevernic, I.; Arthur, J. S. C.; Alessi, D. R.; Cohen, P., The selectivity of protein kinase inhibitors: A further update. *Biochemical Journal* **2007**, 408 (3), 297-315.
25. Machrouhi, F.; Ouhamou, N.; Laderoute, K.; Calaoagan, J.; Bukhtiyarova, M.; Ehrlich, P. J.; Klon, A. E., The rational design of a novel potent analogue of the 5'-AMP- activated protein kinase inhibitor compound C with improved selectivity and cellular activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2010**, 20 (22), 6394-6399.
26. Miglianico, M.; Nicolaes, G. A. F.; Neumann, D., Pharmacological Targeting of AMP-Activated Protein Kinase and Opportunities for Computer-Aided Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**.
27. Hawley, S. A.; Ross, F. A.; Chevtzoff, C.; Green, K. A.; Evans, A.; Fogarty, S.; Towler, M. C.; Brown, L. J.; Ogunbayo, O. A.; Evans, A. M.; Hardie, D. G., Use of cells expressing γ subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metabolism* **2010**, 11 (6), 554-565.
28. Viollet, B.; Foretz, M., Revisiting the mechanisms of metformin action in the liver. *Annales d'Endocrinologie* **2013**, 74 (2), 123-129.
29. Vingtdeux, V.; Giliberto, L.; Zhao, H.; Chandakkar, P.; Wu, Q.; Simon, J. E.; Janle, E. M.; Lobo, J.; Ferruzzi, M. G.; Davies, P.; Marambaud, P., AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid- β peptide metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285 (12), 9100-9113.

30. Vingtdeux, V.; Chandakkar, P.; Zhao, H.; D'Abramo, C.; Davies, P.; Marambaud, P., Novel synthetic small-molecule activators of AMPK as enhancers of autophagy and amyloid- β peptide degradation. *FASEB Journal* **2011**, 25 (1), 219-231.
31. Goldthwait, D. A.; Greenberg, G. R.; Peabody, R. A., The structure of glycinamide ribotide. *The Journal of biological chemistry* **1956**, 221 (2), 1071-1081.
32. Imamura, K.; Ogura, T.; Kishimoto, A.; Kaminishi, M.; Esumi, H., Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, 287 (2), 562-567.
33. Moinet, G.; Marais, D.; Hallakou-Bozec, S.; Charon, C., *Use of AMPK-activating Imidazole Derivatives, Preparation Process Therefor and Pharmaceutical Compositions Comprising Them* **2008**.
34. Gómez-Galeno, J. E.; Dang, Q.; Nguyen, T. H.; Boyer, S. H.; Grote, M. P.; Sun, Z.; Chen, M.; Craigo, W. A.; Van Poelje, P. D.; MacKenna, D. A.; Cable, E. E.; Rolzin, P. A.; Finn, P. D.; Chi, B.; Linemeyer, D. L.; Hecker, S. J.; Erion, M. D., A potent and selective AMPK activator that inhibits de novo lipogenesis. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2010**, 1 (9), 478-482.
35. Cool, B.; Zinker, B.; Chiou, W.; Kifle, L.; Cao, N.; Perham, M.; Dickinson, R.; Adler, A.; Gagne, G.; Iyengar, R.; Zhao, G.; Marsh, K.; Kym, P.; Jung, P.; Camp, H. S.; Frevert, E., Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metabolism* **2006**, 3 (6), 403-416.
36. Scott, J. W.; van Denderen, B. J. W.; Jorgensen, S. B.; Honeyman, J. E.; Steinberg, G. R.; Oakhill, J. S.; Iseli, T. J.; Koay, A.; Gooley, P. R.; Stapleton, D.; Kemp, B. E., Thienopyridone Drugs Are Selective Activators of AMP-Activated Protein Kinase β 1-Containing Complexes. *Chemistry and Biology* **2008**, 15 (11), 1220-1230.
37. Xiao, B.; Sanders, M. J.; Carmena, D.; Bright, N. J.; Haire, L. F.; Underwood, E.; Patel, B. R.; Heath, R. B.; Walker, P. A.; Hallen, S.; Giordanetto, F.; Martin, S. R.; Carling, D.; Gamblin, S. J., Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nature Communications* **2013**, 4.

38. Sanders, M. J.; Ali, Z. S.; Hegarty, B. D.; Heath, R.; Snowden, M. A.; Carling, D., Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, 282 (45), 32539-32548.
39. Hallakou-Bozec, S.; Charon, C.; Poeschke, O.; Hock, B., *Use of Thienopyridone Derivatives as AMPK Activators and Pharmaceutical Compositions Containing Them* **2007**.
40. Cravo, D.; Lepifre, F.; Hallakou-Bozec, S.; Charon, C., *Thienopyridone Derivatives As AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Activators*. WO2009124636 **2009**.
41. Mirguet, O.; Sautet, S.; Clément, C. A.; Toum, J.; Donche, F.; Marques, C.; Rondet, E.; Pizzonero, M.; Beaufile, B.; Dudit, Y.; Huet, P.; Trottet, L.; Grondin, P.; Brusq, J. M.; Boursier, E.; Saintillan, Y.; Nicodeme, E., Discovery of pyridones as oral AMPK direct activators. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, 4 (7), 632-636.
42. Bookser, B. C.; Dang, Q.; Gibson, T. S.; Jiang, H.; Chung, D. M.; Bao, J.; Jiang, J.; Kassick, A.; Kekec, A.; Lan, P.; Lu, H.; Makara, G. M.; Romero, F. A.; Sebhat, I.; Wilson, D.; Wodka, D. Novel cyclic benzimidazole derivatives useful anti-diabetic agents. WO2010036613, **2010**, Merck Sharp & Dohme Corp. and Metathesis Therapeutics, Inc.
43. Bookser, B. C.; Dang, Q.; Gibson, T. S.; Jiang, H.; Chung, D. M.; Bao, J.; Jiang, J.; Kassick, A.; Kekec, A.; Lan, P.; Lu, H.; Makara, G. M.; Romero, F. A.; Sebhat, I.; Wilson, D.; Wodka, D. Cyclic benzimidazole derivatives as AMP-protein kinase activators and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of diseases. WO2010047982A1, **2010**, Merck Sharp & Dohme Corp., USA; Metabasis Therapeutics, Inc. .
44. Dang, Q.; Chung, D. M.; Gibson, T. S.; Jiang, H.; Cashion, D. K.; Bao, J.; Lan, P.; Lu, H.; Makara, G. M.; Romero, F. A.; Sebhat, I.; Wodka, D. Novel cyclic benzimidazole derivatives as AMP-activated protein kinase activators and anti-diabetic agents and their preparation. WO2010051176A1, **2010**, Merck Sharp & Dohme Corp., USA; Metabasis Therapeutics, Inc. .
45. Dang, Q.; Chung, D. M.; Gibson, T. S.; Jiang, H.; Cashion, D. K.; Bao, J.; Lan, P.; Lu, H.; Makara, G. M.; Romero, F. A.; Sebhat, I.; Wodka, D. Novel cyclic benzimidazole derivatives as AMP-activated protein kinase activators and anti-diabetic agents and their preparation. WO2010051206A1, **2010**, Merck Sharp & Dohme Corp., USA; Metabasis Therapeutics, Inc. .

46. Jiang, J.; Kassick, A. J.; Kekec, A.; Sebhat, I. K. Novel cyclic benzimidazole derivatives useful antidiabetic agents. WO2011106273A1, **2011**, Merck Sharp & Dohme Corp., USA .
47. Pang, T.; Zhang, Z. S.; Gu, M.; Qiu, B. Y.; Yu, L. F.; Cao, P. R.; Shao, W.; Su, M. B.; Li, J. Y.; Nan, F. J.; Li, J., Small molecule antagonizes autoinhibition and activates AMP-activated protein kinase in cells. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283 (23), 16051-16060.
48. Yu, L. F.; Li, Y. Y.; Su, M. B.; Zhang, M.; Zhang, W.; Zhang, L. N.; Pang, T.; Zhang, R. T.; Liu, B.; Li, J. Y.; Li, J.; Nan, F. J., Development of novel alkene oxindole derivatives as orally efficacious AMP-activated protein kinase activators. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, 4 (5), 475-480.
49. Li, Y. Y.; Yu, L. F.; Zhang, L. N.; Qiu, B. Y.; Su, M. B.; Wu, F.; Chen, D. K.; Pang, T.; Gu, M.; Zhang, W.; Ma, W. P.; Jiang, H. W.; Li, J. Y.; Nan, F. J.; Li, J., Novel small-molecule AMPK activator orally exerts beneficial effects on diabetic db/db mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2013**, 273 (2), 325-334.
50. Chen, L.; Feng, L.; Huang, M.; Li, J.; Nan, F.; Pang, T.; Yu, L.; Zhang, M. Preparation of alkene oxindole derivatives as activators of AMP activated protein kinase. WO2011033099A1, **2011**, F. Hoffmann-La Roche AG, Switz. .
51. Chen, L.; Huang, M.; Feng, L.; He, Y.; Yun, H. Spiro-cyclopropane-indolinone derivatives as AMPK modulators and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of diseases. WO2011069298A1, **2011**, F. Hoffmann-La Roche AG, Switz. .
52. Nan, F.; Yu, L.; Zhang, M.; Chen, L.; Huang, M.; Feng, L.; Li, J.; Pang, T. Preparation of alkene oxindole derivatives as activators of AMP activated protein kinase. WO2011032320A1, **2011**, F. Hoffmann-La Roche AG, Switz. .
53. O'Farrell, A. M.; Abrams, T. J.; Yuen, H. A.; Ngai, T. J.; Louie, S. G.; Yee, K. W. H.; Wong, L. M.; Hong, W.; Lee, L. B.; Town, A.; Smolich, B. D.; Manning, W. C.; Murray, L. J.; Heinrich, M. C.; Cherrington, J. M., SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* **2003**, 101 (9), 3597-3605.
54. Mendel, D. B.; Douglas Laird, A.; Xin, X.; Louie, S. G.; Christensen, J. G.; Li, G.; Schreck, R. E.; Abrams, T. J.; Ngai, T. J.; Lee, L. B.; Murray, L. J.; Carver, J.; Chan, E.; Moss, K. G.; Haznedar, J. Ö.; Sukbuntherng, J.; Blake, R. A.; Sun, L.; Tang, C.; Miller, T.; Shirazian, S.; McMahon, G.; Cherrington, J. M., In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase

inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: Determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin. Cancer Res.* **2003**, 9 (11), 327-337.

55. Laderoute, K. R.; Calaoagan, J. M.; Madrid, P. B.; Klon, A. E.; Ehrlich, P. J., SU11248 (sunitinib) directly inhibits the activity of mammalian 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK). *Cancer Biology and Therapy* **2010**, 10 (1), 68-75.

56. Birnberg, N. C.; Liu, H.; Weng, Q. P.; Shang, H.; Yin, P.; Rajur, S. B.; Kim, H. O.; Salgaonkar, P. D.; Peet, N. P., *AMPK Modulators* **2009**.

57. Hawley, S. A.; Fullerton, M. D.; Ross, F. A.; Schertzer, J. D.; Chevtzoff, C.; Walker, K. J.; Pegg, M. W.; Zibrova, D.; Green, K. A.; Mustard, K. J.; Kemp, B. E.; Sakamoto, K.; Steinberg, G. R.; Hardie, D. G., The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science* **2012**, 336 (6083), 918-922.

58. Xiao, B.; Heath, R.; Saiu, P.; Leiper, F. C.; Leone, P.; Jing, C.; Walker, P. A.; Haire, L.; Eccleston, J. F.; Davis, C. T.; Martin, S. R.; Carling, D.; Gamblin, S. J., Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* **2007**, 449 (7161), 496-500.

59. Choi, J.; He, N.; Sung, M. K.; Yang, Y.; Yoon, S., Sanguinarine is an allosteric activator of AMP-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2011**, 413 (2), 259-263.

60. Alberti, K. G. M. M.; Zimmet, P. Z., Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine* **1998**, 15 (7), 539-553.

61. O'Neill, H. M.; Maarbjerg, S. J.; Crane, J. D.; Jeppesen, J.; Jørgensen, S. B.; Schertzer, J. D.; Shyroka, O.; Kiens, B.; Van Denderen, B. J.; Tarnopolsky, M. A.; Kemp, B. E.; Richter, E. A.; Steinberg, G. R., AMP-activated protein kinase (AMPK) $\beta 1\beta 2$ muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, 108 (38), 16092-16097.

62. Lochhead, P. A.; Salt, I. P.; Walker, K. S.; Hardie, D. G.; Sutherland, C., 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* **2000**, 49 (6), 896-903.

63. Koo, S. H.; Flechner, L.; Qi, L.; Zhang, X.; Screatton, R. A.; Jeffries, S.; Hedrick, S.; Xu, W.; Boussouar, F.; Brindle, P.; Takemori, H.; Montminy, M., The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* **2005**, *437* (7062), 1109-1114.
64. Lee, Y. S.; Kim, W. S.; Kim, K. H.; Yoon, M. J.; Cho, H. J.; Shen, Y.; Ye, J. M.; Lee, C. H.; Oh, W. K.; Kim, C. T.; Hohnen-Behrens, C.; Gosby, A.; Kraegen, E. W.; James, D. E.; Kim, J. B., Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. *Diabetes* **2006**, *55* (8), 2256-2264.
65. Fullerton, M. D.; Galic, S.; Marcinko, K.; Sikkema, S.; Pulinilkunnil, T.; Chen, Z. P.; O'Neill, H. M.; Ford, R. J.; Palanivel, R.; O'Brien, M.; Hardie, D. G.; MacAulay, S. L.; Schertzer, J. D.; Dyck, J. R. B.; Van Denderen, B. J.; Kemp, B. E.; Steinberg, G. R., Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nature Medicine* **2013**, *19* (12), 1649-1654.
66. Miller, R. A.; Chu, Q.; Xie, J.; Foretz, M.; Viollet, B.; Birnbaum, M. J., Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* **2013**, *494* (7436), 256-260.
67. Vincent, M. F.; Marangos, P. J.; Gruber, H. E.; Van Den Berghe, G., Inhibition by AICA riboside of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Diabetes* **1991**, *40* (10), 1259-1266.
68. García-Prieto, C. F.; Gil-Ortega, M.; Aránguez, I.; Ortiz-Besoain, M.; Somoza, B.; Fernández-Alfonso, M. S., Vascular AMPK as an attractive target in the treatment of vascular complications of obesity. *Vascular Pharmacology* **2015**, *67*, 10-20.
69. Parkin, D. M. F., J.; Curado, M.P.; Bray, F.; Edwards, B.; Shin, H.R.; Forman, D., *Cancer Incidence in Five Continents (CI5)*. 2014.
70. Hawley, S. A.; Boudeau, J.; Reid, J. L.; Mustard, K. J.; Udd, L.; Mäkelä, T. P.; Alessi, D. R.; Hardie, D. G., Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of Biology* **2003**, *2* (4).
71. Shaw, R. J.; Kosmatka, M.; Bardeesy, N.; Hurley, R. L.; Witters, L. A.; DePinho, R. A.; Cantley, L. C., The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101* (10), 3329-3335.

72. Woods, A.; Johnstone, S. R.; Dickerson, K.; Leiper, F. C.; Fryer, L. G. D.; Neumann, D.; Schlattner, U.; Wallimann, T.; Carlson, M.; Carling, D., LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Current Biology* **2003**, *13* (22), 2004-2008.
73. Miyoshi, H.; Nakau, M.; Ishikawa, T. O.; Seldin, M. F.; Oshima, M.; Taketo, M. M., Gastrointestinal hamartomatous polyposis in Lkb1 heterozygous knockout mice. *Cancer Research* **2002**, *62* (8), 2261-2266.
74. Nakau, M.; Miyoshi, H.; Seldin, M. F.; Imamura, M.; Oshima, M.; Taketo, M. M., Hepatocellular carcinoma caused by loss of heterozygosity in Lkb1 gene knockout mice. *Cancer Research* **2002**, *62* (16), 4549-4553.
75. Heiden, M. G. V.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B., Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**, *324* (5930), 1029-1033.
76. Dandapani, M.; Hardie, D. G., AMPK: Opposing the metabolic changes in both tumour cells and inflammatory cells. *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41* (2), 687-693.
77. Dasgupta, B.; Chhipa, R. R., Evolving Lessons on the Complex Role of AMPK in Normal Physiology and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* **2016**, *37* (3), 192-206.
78. Ji, H.; Ramsey, M. R.; Hayes, D. N.; Fan, C.; McNamara, K.; Kozlowski, P.; Torrice, C.; Wu, M. C.; Shimamura, T.; Perera, S. A.; Liang, M. C.; Cai, D.; Naumov, G. N.; Bao, L.; Contreras, C. M.; Li, D.; Chen, L.; Krishnamurthy, J.; Koivunen, J.; Chirieac, L. R.; Padera, R. F.; Bronson, R. T.; Lindeman, N. I.; Christiani, D. C.; Lin, X.; Shapiro, G. I.; Jänne, P. A.; Johnson, B. E.; Meyerson, M.; Kwiatkowski, D. J.; Castrillon, D. H.; Bardeesy, N.; Sharpless, N. E.; Wong, K. K., LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* **2007**, *448* (7155), 807-810.
79. Liu, W.; Monahan, K. B.; Pfeifferle, A. D.; Shimamura, T.; Sorrentino, J.; Chan, K. T.; Roadcap, D. W.; Ollila, D. W.; Thomas, N. E.; Castrillon, D. H.; Miller, C. R.; Perou, C. M.; Wong, K. K.; Bear, J. E.; Sharpless, N. E., LKB1/STK11 Inactivation Leads to Expansion of a Prometastatic Tumor Subpopulation in Melanoma. *Cancer Cell* **2012**, *21* (6), 751-764.
80. Sanchez-Cespedes, M.; Parrella, P.; Esteller, M.; Nomoto, S.; Trink, B.; Engles, J. M.; Westra, W. H.; Herman, J. G.; Sidransky, D., Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Research* **2002**, *62* (13), 3659-3662.

81. Wingo, S. N.; Gallardo, T. D.; Akbay, E. A.; Liang, M. C.; Contreras, C. M.; Boren, T.; Shimamura, T.; Miller, D. S.; Sharpless, N. E.; Bardeesy, N.; Kwiatkowski, D. J.; Schorge, J. O.; Wong, K. K.; Castrillon, D. H., Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. *PLoS ONE* **2009**, *4* (4).
82. Evans, J. M. M.; Donnelly, L. A.; Emslie-Smith, A. M.; Alessi, D. R.; Morris, A. D., Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *British Medical Journal* **2005**, *330* (7503), 1304-1305.
83. Noto, H.; Goto, A.; Tsujimoto, T.; Noda, M., Cancer risk in diabetic patients treated with metformin: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* **2012**, *7* (3).
84. Huang, X.; Wulschleger, S.; Shpiro, M.; McGuire, V. A.; Sakamoto, K.; Woods, Y. L.; McBurnie, W.; Fleming, S.; Alessi, D. R., Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice. *Biochemical Journal* **2008**, *412* (2), 211-221.
85. Faubert, B.; Boily, G.; Izreig, S.; Griss, T.; Samborska, B.; Dong, Z.; Dupuy, F.; Chambers, C.; Fuerth, B. J.; Viollet, B.; Mamer, O. A.; Avizonis, D.; Deberardinis, R. J.; Siegel, P. M.; Jones, R. G., AMPK is a negative regulator of the warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metabolism* **2013**, *17* (1), 113-124.
86. Fay, J. R.; Steele, V.; Crowell, J. A., Energy homeostasis and cancer prevention: The AMP-activated protein kinase. *Cancer Prevention Research* **2009**, *2* (4), 301-309.
87. Liu, X.; Chhipa, R. R.; Pooya, S.; Wortman, M.; Yachyshin, S.; Chow, L. M. L.; Kumar, A.; Zhou, X.; Sun, Y.; Quinn, B.; McPherson, C.; Warnick, R. E.; Kendler, A.; Giri, S.; Poels, J.; Norga, K.; Viollet, B.; Grabowski, G. A.; Dasgupta, B., Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111* (4), E435-E444.
88. Wu, J.; Puppala, D.; Feng, X.; Monetti, M.; Lapworth, A. L.; Geoghegan, K. F., Chemoproteomic analysis of intertissue and interspecies isoform diversity of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (50), 35904-35912.
89. Liu, X.; Chhipa, R. R.; Nakano, I.; Dasgupta, B., The AMPK inhibitor compound C is a potent AMPK-independent antiglioma agent. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13* (3), 596-605.

90. Santidrián, A. F.; González-Gironès, D. M.; Iglesias-Serret, D.; Coll-Mulet, L.; Cosials, A. M.; De Frias, M.; Campàs, C.; González-Barca, E.; Alonso, E.; Labi, V.; Viollet, B.; Benito, A.; Pons, G.; Villunger, A.; Gil, J., AICAR induces apoptosis independently of AMPK and p53 through up-regulation of the BH3-only proteins BIM and NOXA in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* **2010**, *116* (16), 3023-3032.
91. Memmott, R. M.; Mercado, J. R.; Maier, C. R.; Kawabata, S.; Fox, S. D.; Dennis, P. A., Metformin prevents tobacco carcinogen-induced lung tumorigenesis. *Cancer Prevention Research* **2010**, *3* (9), 1066-1076.
92. Zadra, G.; Photopoulos, C.; Tyekucheva, S.; Heidari, P.; Weng, Q. P.; Fedele, G.; Liu, H.; Scaglia, N.; Priolo, C.; Sicinska, E.; Mahmood, U.; Signoretti, S.; Birnberg, N.; Loda, M., A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis. *EMBO Molecular Medicine* **2014**, *6*.
93. Carlisle, B.; Demko, N.; Freeman, G.; Hakala, A.; MacKinnon, N.; Ramsay, T.; Hey, S.; London, A. J.; Kimmelman, J., Benefit, Risk, and Outcomes in Drug Development: A Systematic Review of Sunitinib. *J. Natl. Cancer Inst.* **2016**, *108* (1).
94. Hawley, S. A.; Ross, F. A.; Gowans, G. J.; Tibarewal, P.; Leslie, N. R.; Hardie, D. G., Phosphorylation by Akt within the ST loop of AMPK- α 1 down-regulates its activation in tumour cells. *Biochemical Journal* **2014**, *459* (2), 275-287.
95. Brown, K. A.; Samarajeewa, N. U.; Simpson, E. R., Endocrine-related cancers and the role of AMPK. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2013**, *366* (2), 170-179.
96. Borgdorff, V.; Rix, U.; Winter, G. E.; Gridling, M.; Müller, A. C.; Breitwieser, F. P.; Wagner, C.; Colinge, J.; Bennett, K. L.; Superti-Furga, G.; Wagner, S. N., A chemical biology approach identifies AMPK as a modulator of melanoma oncogene MITF. *Oncogene* **2014**, *33* (19), 2531-2539.
97. O'Neill, L. A. J.; Grahame Hardie, D., Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* **2013**, *493* (7432), 346-355.
98. Steinberg, G. R.; Dandapani, M.; Hardie, D. G., AMPK: Mediating the metabolic effects of salicylate-based drugs? *Trends in Endocrinology and Metabolism* **2013**, *24* (10), 481-487.

99. Krawczyk, C. M.; Holowka, T.; Sun, J.; Blagih, J.; Amiel, E.; DeBerardinis, R. J.; Cross, J. R.; Jung, E.; Thompson, C. B.; Jones, R. G.; Pearce, E. J., Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* **2010**, *115* (23), 4742-4749.
100. Sag, D.; Carling, D.; Stout, R. D.; Suttles, J., Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *Journal of Immunology* **2008**, *181* (12), 8633-8641.
101. Yang, Z.; Kahn, B. B.; Shi, H.; Xue, B. Z., Macrophage $\alpha 1$ AMP-activated protein kinase ($\alpha 1$ AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285* (25), 19051-19059.
102. Rothwell, P. M.; Fowkes, F. G. R.; Belch, J. F.; Ogawa, H.; Warlow, C. P.; Meade, T. W., Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: Analysis of individual patient data from randomised trials. *The Lancet* **2011**, *377* (9759), 31-41.
103. Liu, Y. J.; Chern, Y., AMPK-mediated regulation of neuronal metabolism and function in brain diseases. *Journal of Neurogenetics* **2015**.
104. Craft, S., The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: Two roads converged. *Arch. Neurol.* **2009**, *66* (3), 300-305.
105. Ronnett, G. V.; Ramamurthy, S.; Kleman, A. M.; Landree, L. E.; Aja, S., AMPK in the brain: Its roles in energy balance and neuroprotection. *J. Neurochem.* **2009**, *109* (SUPPL. 1), 17-23.
106. Cai, Z.; Yan, L. J.; Li, K.; Quazi, S. H.; Zhao, B., Roles of AMP-activated protein kinase in Alzheimer's disease. *NeuroMolecular Medicine* **2012**, *14* (1), 1-14.
107. Manwani, B.; McCullough, L. D., Function of the master energy regulator adenosine monophosphate-activated protein kinase in stroke. *J. Neurosci. Res.* **2013**, *91* (8), 1018-1029.
108. Li, J.; McCullough, L. D., Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **2010**, *30* (3), 480-492.
109. Xu, L.; Ash, J. D., The role of AMPK pathway in neuroprotection. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016; Vol. 854, pp 425-430.

110. McCullough, L. D.; Zeng, Z.; Li, H.; Landree, L. E.; McFadden, J.; Ronnett, G. V., Pharmacological inhibition of AMP-activated protein kinase provides neuroprotection in stroke. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (21), 20493-20502.
111. Venna, V. R.; Li, J.; Hammond, M. D.; Mancini, N. S.; McCullough, L. D., Chronic metformin treatment improves post-stroke angiogenesis and recovery after experimental stroke. *Eur. J. Neurosci.* **2014**, *39* (12), 2129-2138.
112. Finkel, T., The metabolic regulation of aging. *Nat. Med.* **2015**, *21* (12), 1416-1423.
113. Liu, F.; Benashski, S. E.; Persky, R.; Xu, Y.; Li, J.; McCullough, L. D., Age-related changes in AMP-activated protein kinase after stroke. *Age* **2012**, *34* (1), 157-168.

CAPITULO 2

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO DE NUEVOS ACTIVADORES DE AMPK DERIVADOS DE 4-HIDROXI-QUINOLONA

| | |
|--|---------|
| 2.1 Introducción y objetivos | 70 |
| 2.2 Resultados | 73 |
| 2.2.1 Síntesis | 73 |
| A. Síntesis de las 4-hidroxiquinolonas bromadas precursoras | 73 |
| B. Acoplamientos de Suzuki-Muyaira | 75 |
| 2.2.2 Estudios de activación enzimática frente a AMPK | 78 |
| 2.2.3 Estudio de solubilidad termodinámica | 79 |
| 2.2.4 Estudios de activación en células de AMPK | 80 |
| 2.2.5 Ensayos de la actividad antiinflamatoria | 81 |
| 2.3 Discusión | 84 |
| 2.4 Conclusiones | 86 |
| 2.5 Procedimientos experimentales | 87 |
| 2.5.1 Métodos generales | 87 |
| 2.5.2 Procedimientos de síntesis | 88 |
| 2.5.3 Ensayos in vitro de activación de AMPK | 100 |
| 2.5.4 Medidas de la activación en células de AMPK | 100 |
| 2.5.5 Ensayos de activación de células T de bazo de ratón | 102 |
| 2.5.6 Ensayos de medida de la solubilidad termodinámica | 103 |
| Bibliografía del capítulo 2 | 105 |

2. Síntesis y evaluación del potencial antiinflamatorio de nuevos activadores de AMPK derivados de 4-hidroxi-quinolona.

2.1. Introducción y objetivos

Como se comentó en el capítulo de introducción, una de las familias químicas privilegiadas en la activación de AMPK para el tratamiento de la diabetes, el síndrome metabólico y la obesidad lo constituyen las tienopiridonas. El descubrimiento de esta familia se lo debemos a los trabajos de Cool *et al.*, de Laboratorios Abbott, en 2006¹⁻⁴, en los que partiendo de una librería de unos 700.000 compuestos, identificaron la molécula A-592107 (**2.1**, **figura 2.1**)⁵, que presentaba una potencial similar a AMP. La optimización estructural de este prototipo desembocó en la síntesis de activadores estructuralmente relacionados, culminando en la identificación de A-769662 (**2.2**), con una $EC_{50} = 0.8 \mu M$.

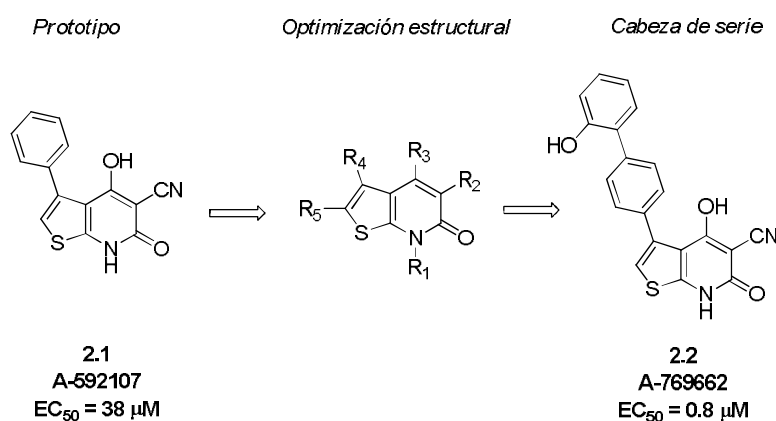


Figura 2.1. Optimización de los derivados de tienopiridona

La importancia y el interés que despierta A-769662 ya se puso de manifiesto en la introducción, y se basa en un modo de acción característico que lo ha convertido en una herramienta canónica para el estudio tanto de nuevos moduladores de la proteína como de sus mecanismos de acción en condiciones sanas y patológicas.

A-769662 no se une a los sitios de unión de AMP, lo que lo convierte en un activador de naturaleza alostérica⁶ y su unión es por tanto reversible y no competitiva con el activador

endógeno, reforzándose la acción de ambos de manera sinérgica. Este activador actúa independientemente del tejido o de la especie de la que procediera la proteína^{1,2}.

Como se comentó en el capítulo 1, estudios estructurales recientes⁷⁻⁸ muestran que la zona de unión de A-769662 es una hendidura situada entre la superficie opuesta del módulo de unión a carbohidratos de la subunidad β (β -CBM) y el lóbulo N-terminal del dominio quinasa de la subunidad α (α -KD). Este sitio viene denominándose “sitio de modulación alostérica” (o sitio ADaM, *Allosteric Drug and Metabolite site*), ya que en él se alojan otros fármacos y metabolitos en su interacción con la proteína⁹, como el salicilato, que parece actuar de la misma manera¹⁰. En la estructura que se muestra en la **figura 1.1**, en el capítulo 1, este sitio está señalado, pero desocupado, y el oligosacárido β -ciclodextrina está ocupando el CBM⁶. La unión de A-769662 estabiliza la interacción entre el CBM y el KD, a través de la formación de un bolsillo. Para ello es necesaria la fosforilación del residuo Ser-108 de la subunidad β . Por tanto, la acción de A-769662 es independiente de la fosforilación de Thr-172¹¹⁻¹², pero dependiente de la de Ser-108. La conformación producida con la formación de este anillo protege la proteína de la desfosforilación en Thr-172, y en este efecto consiste su acción activadora¹³.

Una de las propiedades más interesantes de A-769662 es su selectividad por la isoforma $\beta 1$ ¹⁴, pues sólo ésta contiene una secuencia de aminoácidos en una disposición adecuada para la interacción con el fármaco⁸ (**figura 2.2**). Dada la influencia de las diferentes subunidades, y especialmente del CBM de la subunidad β , en la localización tisular, esta selectividad puede ser una herramienta importante a explotar de cara al desarrollo de moduladores de AMPK para patologías relacionadas con la localización de un heterotrímero específico en un órgano o sistema en particular.

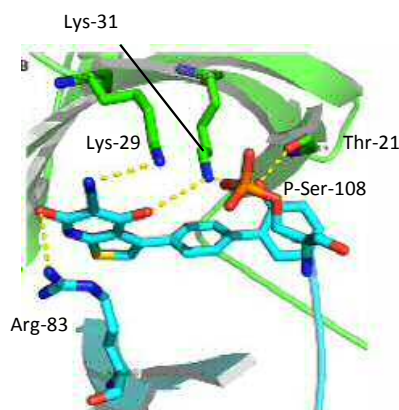


Figura 2.2. Esquema del acoplamiento de A-769662 en $\alpha 2\beta 1\gamma 1$, con representación de las interacciones polares estabilizantes. Los residuos representados en verde pertenecen al dominio quinasa, y los representados en azul, al CBM. Tomado de Rana et al., 2015 y Xiao et al., 2013.

La principal desventaja de cara al posible desarrollo farmacéutico de este compuesto es su pobre biodisponibilidad oral ($F=7\%$)¹, poniendo de manifiesto la necesidad del desarrollo de nuevos programas de análogos enfocados a la mejora de propiedades farmacocinéticas.

Todos estos estudios ponen de manifiesto el potencial de A-769662, que le sitúa no sólo como cabeza de serie de muchos proyectos de optimización estructural para el descubrimiento de nuevos candidatos a fármacos que actúen a nivel de AMPK, sino como herramienta farmacológica para el estudio de los mecanismos de regulación que media esta quinasa¹⁵.

En este contexto, este trabajo toma el interesante perfil de A-769662 como punto de partida para el desarrollo de nuevos análogos estructuralmente relacionados, proponiendo tanto sustituciones bioisósteras, como modificaciones que incrementaran su carácter hidrófilo, pudiendo de esta manera obtener compuestos con un perfil mejorado de solubilidad acuosa. Para ello, se plantean una serie de variaciones estructurales que se recogen en la **figura 2.3**.

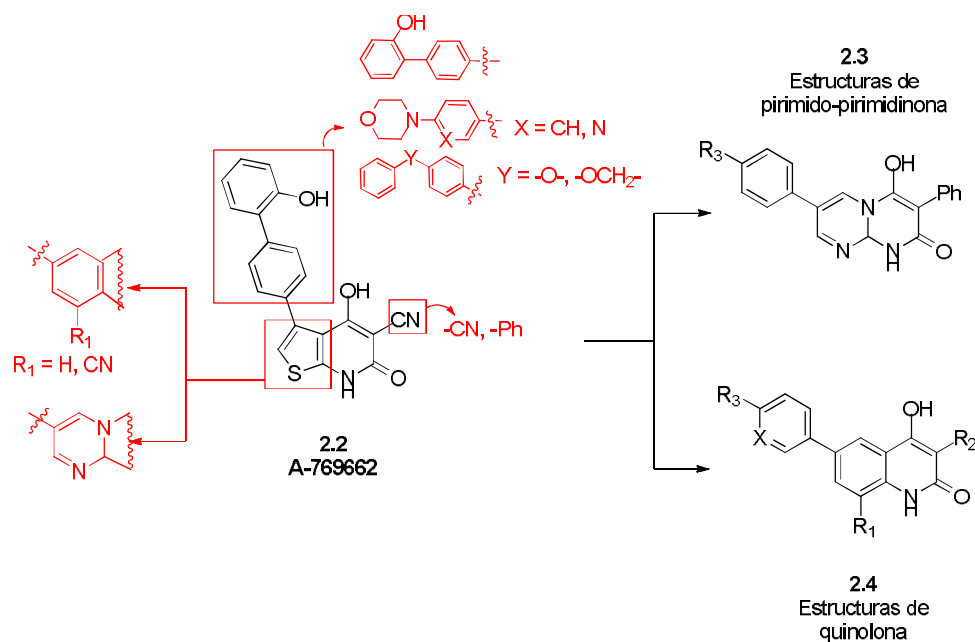


Figura 2.3. Modificaciones propuestas sobre el prototipo A-769662.

Como se observa en la **figura 2.3**, con respecto a la naturaleza del sistema aromático fusionado al núcleo de piridona, se propone la sustitución del anillo de tiofeno por anillos aromáticos de distinta naturaleza tales como el benceno y la pirimidina. Cuando el sistema fusionado es el anillo de benceno, se plantean modificaciones químicas en dos de las posiciones del sistema resultante de quinolona: la sustitución del ciano en posición 3 por un fenilo, y por otro lado la

modificación del sistema biarílico en posición 5 de la tienopiridona por agrupamientos de naturaleza polar del tipo aril-morfolina y/o aril-piridina o sistemas arílicos unidos con espaciadores tipo éter, con el fin de preparar compuestos más solubles.

Como se ha comentado, los numerosos estudios farmacológicos realizados con el prototipo A-769662 le convierten en un activador bien contrastado para la validación de nuevas acciones terapéuticas mediadas por AMPK. Entre otras importantes funciones, existen numerosas evidencias del papel que la proteína desempeña en la interrelación entre el sistema inmune y el metabolismo energético¹⁶⁻¹⁸, tanto a nivel celular¹⁹⁻²¹, como de eficacia *in vivo* en el tratamiento de enfermedades autoinmunes²². De manera que a la vista del potencial terapéutico que pueden presentar el uso de activadores de AMPK en el tratamiento de enfermedades con un componente inflamatorio, se plantea la realización de ensayos biológicos adicionales encaminados a determinar el potencial antiinflamatorio de los nuevos compuestos.

2.2. Resultados

2.2.1. Síntesis

El método de síntesis más frecuente para la obtención de las tienopiridonas del tipo de **2.2** (**figura 2.3**) se base en el empleo de reacciones de acoplamiento carbono-carbono (C–C) catalizadas por paladio, usando el derivado borónico correspondiente al resto biarílico en posición 6 sobre la 6-bromotienopiridona. Basándonos en este antecedente, se plantea usar esta misma estrategia sintética para la preparación de los compuestos que se proponen en este capítulo.

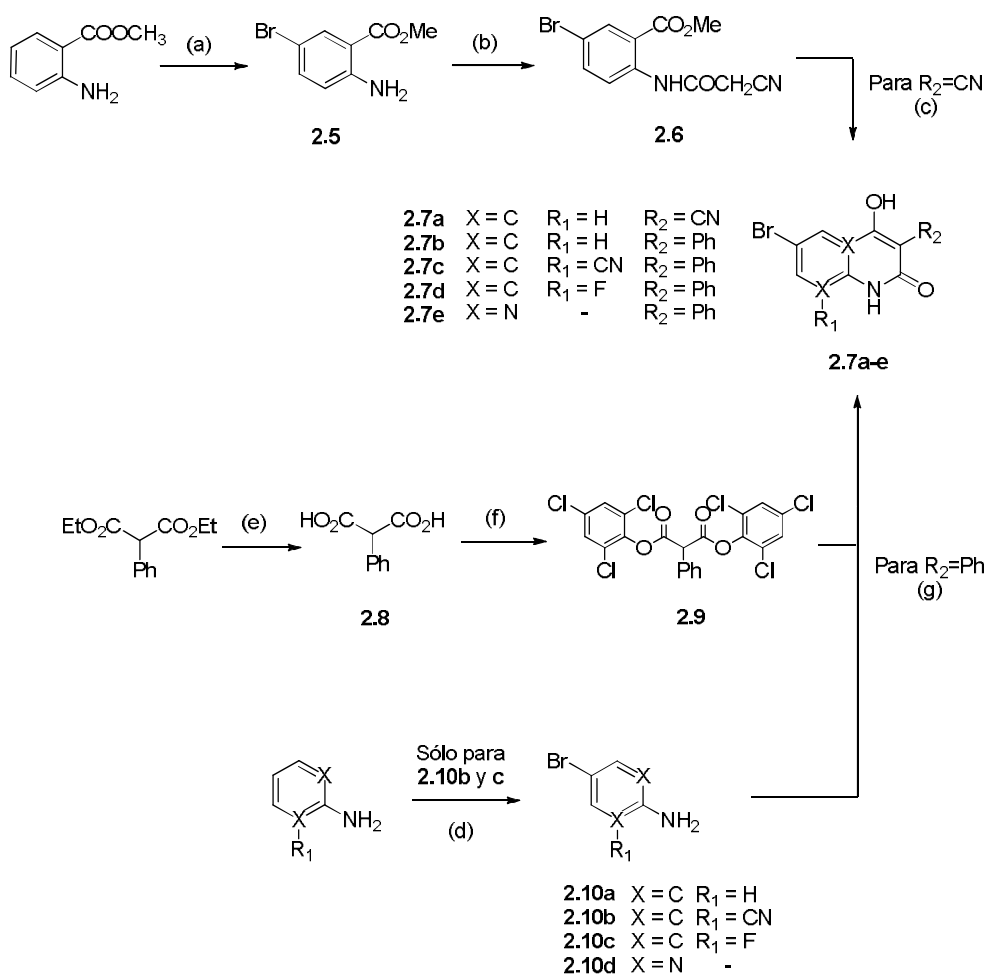
A. Síntesis de las 4-hidroxiquinolonas bromadas precursoras.

La síntesis de las 6-bromo-4-hidroxiquinolonas propuestas varía en función de la naturaleza del sustituyente en posición 3 del heterociclo, según se recoge en el **esquema 2.1**.

La obtención del derivado de 2-oxoquinolin-3-carbononitrilo **2.7a** se consigue mediante una ciclación en medio básico, siguiendo un procedimiento previamente descrito. Así, en primer lugar, se procede a la bromación selectiva en posición *para* del antranilato de metilo,

obteniendo el intermedio bromado **2.5**. La selectividad se consigue usando N-bromosuccinimida y acetato amónico como catalizador²³. La reacción del grupo amino con el cloruro de ácido del ácido cianoacético en medio básico conduce al intermedio **2.6** con buen rendimiento (78%)²⁴. Este compuesto presenta un metileno muy ácido porque el enolato está estabilizado por los grupos carbonilo y ciano en β , de forma que la ciclación es sencilla en un medio básico de hidruro de sodio, según condiciones descritas en bibliografía²⁴, y con un rendimiento del 66 %.

Para la obtención de los precursores bromados, derivados de 3-fenil-1,2-dihidroquinolina (**2.7b–2.7e**), fue necesario en primer lugar la activación del ácido fenilmalónico. Para ello se llevó a cabo la hidrólisis del éster etílico en medio ácido seguida de la esterificación en presencia de cloruro de oxalilo y 2,4,6-triclorofenol, obteniéndose el derivado de malonato activado **2.9**²⁵⁻²⁷ con un rendimiento del 78%. Este compuesto es muy buen electrófilo, debido a la estabilidad de los aniones 2,4,6-triclorofenóxido que actúan como grupos salientes. Por otro lado, la bromación selectiva de las anilinas se lleva a cabo usando el método comentado previamente para el intermedio **2.5**²³, obteniendo los intermedios bromados **2.10a–d**, con rendimientos entre el 35–52%. Finalmente, la obtención de los derivados de las 6-bromoquinolonas **2.7 b–e** se realiza mediante calefacción en microondas²⁵⁻²⁶. Este método general descrito para la síntesis de estructuras de 4-hidroxiquinolona ofrece numerosas ventajas frente a otras rutas. En primer lugar, permite el empleo de un amplio rango de anilinas sustituidas incluso por grupos electrón-atractores, además de sistemas heterocíclicos de distinta naturaleza. En segundo lugar, el empleo de **2.9** es más seguro que los malonatos de etilo, más habituales, porque evita la formación de etanol como subproducto, que puede provocar sobrepresiones a temperaturas tan altas²⁵⁻²⁶. Por último, facilita el procesado porque en muchas ocasiones no es necesario disolvente, como para el caso de los compuestos **2.10 a–c**, ya que los reactivos funden a la temperatura de reacción.

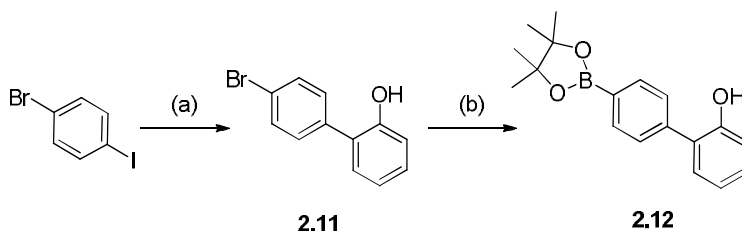


Esquema 2.1. Síntesis de las 6-bromoquinolonas **2.7 a-e**. Reactivos y condiciones: (a) NBS (1.05 eq.), NH₄OAc (10 %mol), MeCN, 70 °C, 4 h, 90 %; (b) Ácido cianoacético (1.5 eq.), PCl₅ (1.5 eq.), CH₂Cl₂, 60 °C, 1 h, 78 %; (c) NaH (4 eq.), THF, ref., 5 h, 66 %; (d) NBS (1.05 eq.), NH₄OAc (10 %mol), MeCN, 0 °C, 5 – 20 min., 35 – 52 %; (e) KOH_{ac} (4.1 eq.), 90 °C, 3 h, 69 %; (f) C₂O₂Cl₂ (2.56 eq.), DCM, t.a., 1 h, 2,4,6-triclorofenol (2.7 eq.), 12 h, 25 °C, 78 %; (g) **2.9** (1.5 – 2 eq.), m. o., THF anh. – sin dvte., 10 - 17 min., 200 – 248 °C, 45 – 84 %.

B. Acoplamiento de Suzuki-Miyaura

Para la obtención de los compuestos finales, fue necesario poner a punto las reacciones de acoplamiento C-C entre los derivados bromados previamente preparados, **2.7 a-e**, y los ácidos y ésteres borónicos correspondientes, así como para la preparación de derivados borónicos clave para la síntesis de los productos finales. En concreto, el derivado de ester borónico que permite acceder al mismo sustituyente biarílico presente en A-769662, el resto 2'-hidroxibifenilo, no comercial. De esta manera, será posible evaluar rigurosamente la relación estructura-actividad debidas a las sustituciones que afectan a los sistemas biarílicos.

El resto 2'-hidroxibifenilo forma parte de un éster borónico, **2.12** (esquema 2.2), al que se accede sencillamente a través de otro precursor bromado, **2.11**, usando bis(pinacolato)diboro y con buenos rendimiento según procedimientos descritos en bibliografía¹¹. El precursor bromado **2.11** tuvo asimismo que ser preparado usando otro acoplamiento de Suzuki entre el 4-bromo-iodobenceno y el ácido 2-hidroxifenilborónico^{8, 28} (esquema 2.2).



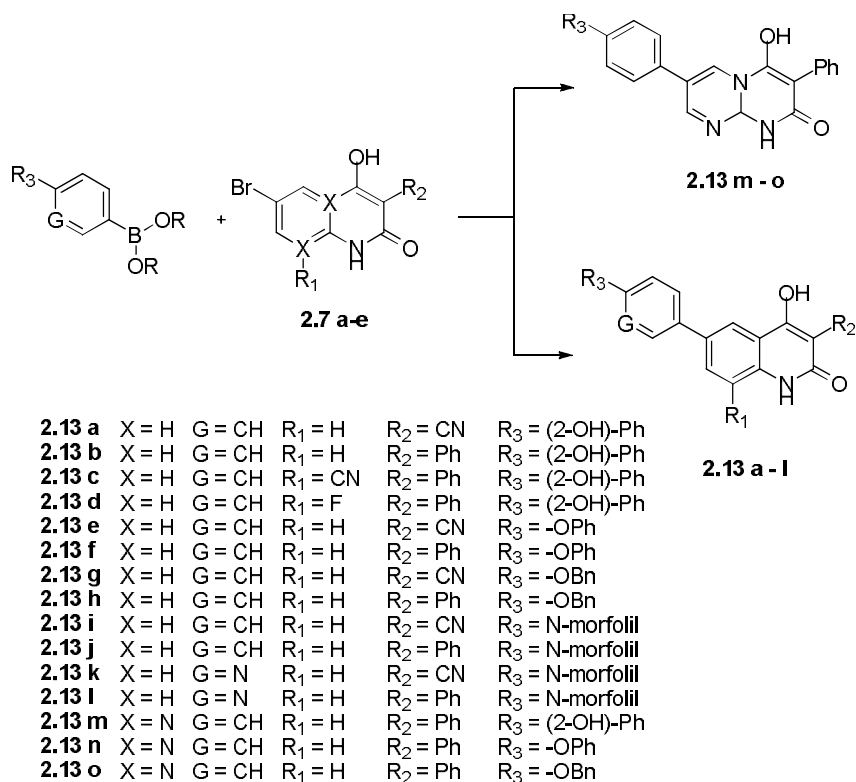
Esquema 2.2. Síntesis de 2'-hidroxifenil boronato **2.12**. Reactivos y condiciones: (a) Ácido 2-hidroxifenilborónico (1 eq.), K_3PO_4 ac. (1.56 eq.), $Pd(PPh_3)_4$ (2.5 %mol), 1,4-dioxano, 115 oC, 12 h, 88 %; (b) Bis(pinacolato)diboro (1.12 eq.), $Pd(dppf)Cl_2$ (2.5 %mol), KOAc (2.71 %mol), 1,4-dioxano, m.o., 150 °C, 10 min., 83 %;

A modo de breve introducción, las reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por paladio se han convertido en uno de los procesos de mayor interés en química orgánica. Los compuestos organometálicos son ideales para llevarlas a cabo debido a que la polaridad del enlace carbono-metal confiere un carácter nucleófilo al carbono unido a él, haciendo que éste pueda reaccionar con electrófilos orgánicos conduciendo a la formación de un enlace sencillo C-C. Así, desde su descubrimiento en 1979, la reacción de Suzuki-Miyaura ha sido una de las herramientas más poderosas para la construcción de enlaces C-C. Esta reacción implica el acoplamiento de un electrófilo orgánico, como pueden ser triflatos o haluros de arilo o alquénilo, con un ácido borónico, un borato de dialquilo o un trifluoroborato en presencia de una base. El papel de la base es facilitar la transmetalación formando especies más reactivas como son los boronatos.

Las reacciones de Suzuki-Miyaura han demostrado ser extremadamente versátiles y han encontrado un uso extensivo en síntesis de productos naturales y síntesis heterocíclica. Además, la amplia diversidad de organoboranos y su relativa estabilidad al aire y al agua, han hecho de esta reacción un proceso muy utilizado en química orgánica²⁹.

En nuestro caso, para la preparación de los compuestos finales **2.13 a–o**, se usó la mezcla de disolventes 1,4-dioxano:tolueno:etanol:agua 10:1:3:6³, salvo para **2.13 m**, para el cual los mejores resultados se obtuvieron con la mezcla 1,4-dioxano:metanol 5:1. Se emplea también

exceso de derivado borónico, en general de 1.5 equivalentes. Salvo para **2.13 k** se pudo completar la reacción con 1.12 eq., y para **2.13 b-d**, con 1.45 eq. El catalizador empleado en todos los casos fue tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), en una proporción del 2 % molar, salvo para **2.13 l**, en el que fue necesario usar al 5 %mol (**esquema 2.3**).

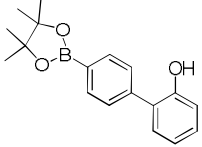
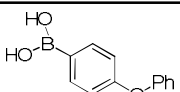
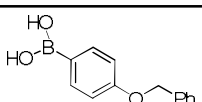
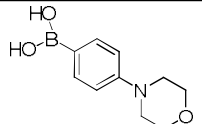
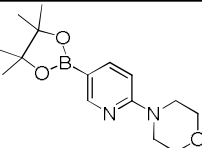


Esquema 2.3. Síntesis de las quinolonas y pirimido-pirimidinonas finales **2.13**. Síntesis de las 6-bromoquinolonas **2.7 a-e**. Reactivos y condiciones: Para **2.13 a, e-k, n-o**: derivado borónico (1.5 eq.), Cs₂CO₃ (2 eq.), Pd(PPh₃)₄ (2 %mol), 1,4-dioxano:MePh:EtOH:H₂O 10:1:3:6, atm. N₂, 100 °C, 8 – 12 h; Para **2.13 b-d**: **2.12** (1.45 eq.), K₂CO₃ (2 eq.), Pd(PPh₃)₄ (2 %mol), 1,4-dioxano:MePh:EtOH:H₂O 10:1:3:6, m.o., 120 °C, 75 min.; Para **2.13 k**: Éster borónico (1.12 eq.), Cs₂CO₃ (2 eq.), Pd(PPh₃)₄ (2 %mol), dioxano:MePh:EtOH:H₂O 10:1:3:6, m.o., 120 °C, 75 min.; Para **2.13 l**: éster borónico (1.5 eq.), K₂CO₃ (2 eq.), Pd(PPh₃)₄ (5 %mol), 1,4-dioxano:MePh:EtOH:H₂O 10:1:3:6, m.o., 120 °C, 20 min; Para **2.13 m**: éster borónico (1.5 eq.), Cs₂CO₃ (2 eq.), Pd(PPh₃)₄ (2 %mol), 1,4-dioxano:MeOH 5:1, m.o., 120 °C, 1.5 h.

En cuanto a los métodos de calefacción, la **tabla 2.1** muestra que se empleó tanto calefacción convencional como irradiación con microondas. En concreto, cuando se usaron los derivados de ésteres borónicos, las condiciones de calefacción empleadas fueron calentamiento en reactor de microondas (compuestos **2.13 b – m** y **2.13 l**). Con la excepción de **2.13 a** y **k**, que ofrecieron mejores rendimientos con calefacción convencional a 100 °C durante una noche pese a que se trataba de ésteres. Cuando se usaron ácidos borónicos, se llevó a cabo

calefacción convencional. Los rendimientos son en general modestos, obteniendo el valor máximo de 74 % para **2.13 g** y el mínimo de 2 % para **2.13 d**.

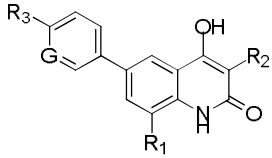
Tabla 2.1. Condiciones de reacción para la síntesis de las quinolonas y pirimido-pirimidinonas **2.13**

| Sustrato | Derivado borónico | Producto | Base | Calefacción | Tiempo de reacción | r, % |
|--------------|---|---------------|---------------------------------|---------------|--------------------|------|
| 2.7 a |  | 2.13 a | Cs ₂ CO ₃ | 100 °C, | 8-12 h | 25 |
| 2.7 b | | 2.13 b | K ₂ CO ₃ | m.o., 120 °C, | 75 min | 14 |
| 2.7 c | | 2.13 c | | m.o., 120 °C, | 75 min | 7 |
| 2.7 d | | 2.13 d | | m.o., 120 °C, | 75 min | 2 |
| 2.7 e | | 2.13 m | | m.o., 120 °C, | 1.5 h | 59 |
| 2.7 a |  | 2.13 e | Cs ₂ CO ₃ | 100 °C | 8-12 h | 8 |
| 2.7 b | | 2.13 f | | 100 °C | 8-12 h | 12 |
| 2.7 e | | 2.13 n | | 100 °C | 8-12 h | 47 |
| 2.7 a |  | 2.13 g | | 100 °C | 8-12 h | 74 |
| 2.7 b | | 2.13 h | | 100 °C | 8-12 h | 59 |
| 2.7 e | | 2.13 o | | 100 °C | 8-12 h | 32 |
| 2.7 a |  | 2.13 i | | 100 °C | 8-12 h | 32 |
| 2.7 b | | 2.13 j | | 100 °C | 8-12 h | 23 |
| 2.7 a |  | 2.13 k | | 100 °C | 8-12 h | 19 |
| 2.7 b | | 2.13 l | K ₂ CO ₃ | m.o., 120 °C | 20 min | 45 |

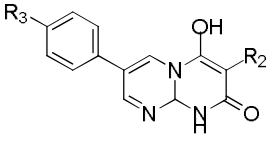
2.2.2 Estudios de activación enzimática frente a AMPK

La evaluación biológica inicial de la familia de las piridonas se llevó a cabo a través de un ensayo enzimático fluorométrico con la isoforma de AMPK recombinante $\alpha 1\beta 1\gamma 2$. Este ensayo evalúa la capacidad de fosforilación de AMPK al péptido sustrato AMARAASAAALARRR. Los compuestos fueron evaluados a concentraciones 30 μ M, utilizando como control del ensayo el activador endógeno, AMP, y el activador descrito por Abbott, A-769662. Los resultados se muestran en la **tabla 2.2**.

Tabla 2.2. Resultados del ensayo de activación de AMPK $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ *in vitro*.



2.13 a - l



2.13 m - o

| Compuesto | X | G | R ₁ | R ₂ | R ₃ | % control 30 μ M | % control 200 μ M |
|---------------|---|----|----------------|----------------|----------------|-------------------------|--------------------------|
| AMP | - | - | - | - | - | - | 411 |
| A-769662 | - | - | - | - | - | 647-776 | - |
| 2.13 a | C | CH | H | CN | (2-OH)Ph- | 424 | - |
| 2.13 c | C | CH | CN | Ph | (2-OH)Ph- | 97 | - |
| 2.13 f | C | CH | H | Ph | PhO- | 129 | - |
| 2.13 g | C | CH | H | CN | BnO- | 131 | - |
| 2.13 h | C | CH | H | Ph | BnO- | 118 | - |
| 2.13 i | C | CH | H | CN | N-morfolilo | 250 | - |
| 2.13 j | C | CH | H | Ph | N-morfolilo | 206 | - |
| 2.13 k | C | N | H | CN | N-morfolilo | 84 | - |
| 2.13 l | C | N | H | Ph | N-morfolilo | 122 | - |
| 2.13 m | N | CH | - | Ph | (2-OH)Ph- | 175 | - |
| 2.13 n | N | CH | - | Ph | PhO- | 118 | - |
| 2.13 o | N | CH | - | Ph | BnO- | 136 | - |

A partir de los datos obtenidos se pueden extraer las primeras relaciones estructura-actividad. Así, con respecto a la modificación en R₂, los datos de activación parecen indicar la preferencia por el grupo ciano frente al fenilo, tal y como se observa en los análogos: **2.13 g** (131 %) frente a **2.13 h** (118%), **2.13 i** (250 %) frente a **2.13 j** (206 %) o **2.13 k** (84 %) frente a **2.13 l** (122 %). En cuanto a la naturaleza del sustituyente R₃, el agrupamiento con 2'-hidroxibifenilo mostró los mejores datos de activación, concretamente para **2.13a** (424%), seguido de los derivados portadores del resto N-morfolilfenilo **2.13i** (250%). Finalmente, las modificaciones llevadas a cabo sobre el sistema aromático fusionado, ponen de manifiesto que la sustitución bioisótera por el grupo benceno es la que condujo a los mejores valores de activación *in vitro*, si bien la sustitución por el sistema de pirimidina dio lugar a compuestos con un perfil de activadores, aunque con valores sensiblemente inferiores, destacando **2.13 m** (175%).

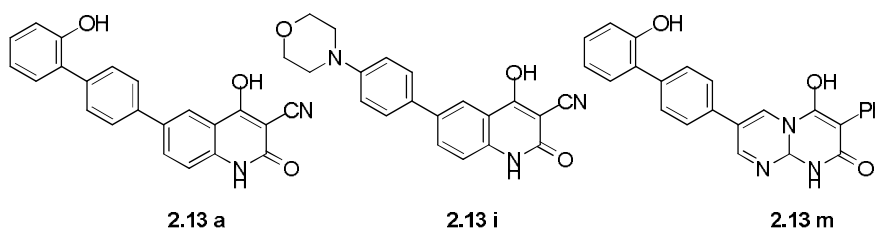
2.2.3 Estudio de solubilidad termodinámica

A la vista de los resultados de activación enzimática y con el fin de evaluar la influencia de las modificaciones propuestas sobre la solubilidad de los compuestos, se seleccionaron los derivados **2.13a**, **2.13i** y **2.13m** para llevar a cabo ensayos de solubilidad termodinámica,

basándose en los datos de activación e intentando evaluar ejemplos representantes de cada subclase química preparada.

Para ello, se preparó una disolución patrón del compuesto a estudiar a una concentración 10 mM en DMSO. A partir de esta disolución patrón, se prepara una recta de calibrado por adición de tampón pH 5.5 hasta concentraciones finales de DMSO del 5% y agitación de las disoluciones resultantes durante 2 h. La solubilidad se determina a partir de una disolución de la muestra en el tampón pH 5.5 y con un 5 % de DMSO usando esta recta de calibrado. Los resultados se encuentran recogidos en la **tabla 2.3**.

Tabla 2.3: Resultados de solubilidad termodinámica de los compuestos **2.13 a**, **2.13 i** y **2.13 m**



| Compuesto | X | G | R ₁ | R ₂ | R ₃ | Solubilidad Termodinámica (μM) |
|---------------|---|---|----------------|----------------|----------------|--------------------------------|
| 2.13 a | C | C | H | CN | (2-OH)Ph– | 12 |
| 2.13 i | C | C | H | CN | N-morfolilo | 17800 |
| 2.13 m | N | C | - | Ph | (2-OH)Ph– | 707 |

Como se puede observar, tanto la sustitución del agrupamiento en posición 6 por el resto de morfolina (**2.13i**) como la fusión por un sistema de pirimidina (**2.13 m**) conducen a una clara mejora de la solubilidad termodinámica con respecto al compuesto **2.13a**.

2.2.4 Estudios de activación en células de AMPK

Con el fin de determinar si los compuestos **2.13a**, **2.13i** y **2.13m** inducen la activación de AMPK en cultivos celulares, se llevaron a cabo ensayos de la fosforilación de Thr172 en cultivo celular, empleando la línea celular HEK-293. Las células se trataron a las concentraciones indicadas en la figura 2.3 para los diferentes activadores durante 1 hora, utilizando como control positivo del ensayo fenformina a la concentración de 5 mM. Las células son lisadas y analizadas mediante *Western blot* usando anti-phosphoThr172 y anti-fosfo-Ser79 ACC (uno de los sustratos de la actividad de fosforilación por AMPK) y anti-AMPKβ, que reconoce la

proteína no fosforilada, como control de carga. Como se muestra en la **figura 2.3**, los tres compuestos analizados permiten la detección tanto de AMPK fosforilada en la treonina 172 como de su sustrato ACC fosforilada en la serina 79 en células HEK-293, demostrando su actividad biológica como activadores de AMPK.

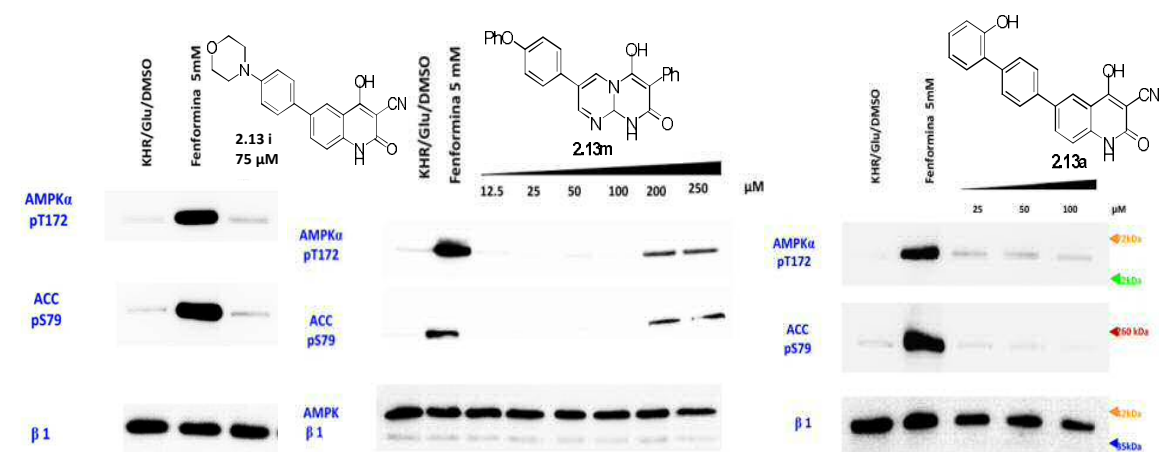


Figura 2.3. Efecto de activación de AMPK de los compuestos **2.13 a, i, m**. Las células Hek293 son tratadas con las concentraciones indicadas en la figura durante 1 hora. Las células lisadas son analizadas mediante *Western Blot* usando anti-phosphoThr172 AMPK alfa, anti-AMPKβ1 (usado como control de carga), anti-phosphoSer79ACC y anti-ACC (usado como control de carga). Los marcadores moleculares de peso están indicados a la derecha de la figura.

2.2.5 Ensayos de la actividad antiinflamatoria

Dado que AMPK está también involucrada en procesos de respuesta inflamatoria, se llevaron a cabo estudios encaminados a explorar su influencia en dichas rutas fisiológicas. Para ello, junto con los compuestos **2.13 a, i, m**, se seleccionaron dos activadores de AMPK previamente conocidos. Por una parte, se utilizó AICAR, cuyo producto metabólico ZMP es un análogo de AMP, por lo que sus efectos biológicos no tienen por qué ser específicos de AMPK. Y por otra parte utilizamos el derivado de Abbott, A-769662, cuyo mecanismo de acción es específico sobre AMPK, ya que se une directamente a la proteína.

Quisimos determinar posibles efectos de la activación de AMPK por estos compuestos sobre la activación de los linfocitos T. La activación de los linfocitos T se produce a través de su receptor de membrana para antígeno (TCR). En esta activación colaboran una serie de moléculas coestimuladoras como CD28 que modulan la señal intracelular. Como resultado de esta

estimulación, la célula T responde proliferando y produciendo las citoquinas encargadas de mediar la respuesta inmunológica. Para ensayar la activación de células T se utilizaron dos anticuerpos, uno de ellos dirigido contra uno de los componentes del TCR (anti-CD3) y otro dirigido contra CD28 (anti-CD28). Esta combinación de anticuerpos mimetiza la activación por antígeno. Como fuente de linfocitos T se utilizaron células de bazo de ratón. Para valorar los efectos de los activadores de AMPK sobre la función de linfocitos T se utilizaron distintas concentraciones de cada uno de los compuestos sobre estos ensayos de activación y se cuantificó la proliferación celular y la producción de algunas citoquinas implicadas en procesos inflamatorios.

La activación de linfocitos T se valoró en primer lugar por medidas de proliferación por ensayo colorimétrico, tal y como se describe en el apartado de métodos. La **figura 2.4** muestra los datos resultantes.

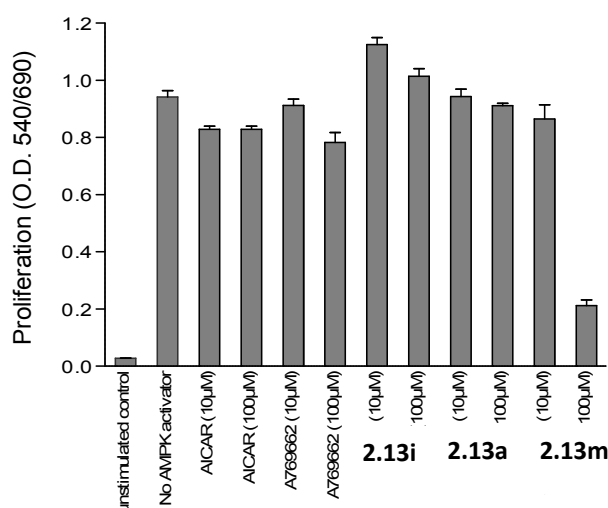


Figura 2.4. Ensayo de proliferación de células T de bazo mediada por estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de los activadores de AMPK. Unstimulated control corresponde al valor de densidad óptica mostrado por células en ausencia de anti-CD3/anti-CD28.

Como se puede observar, todos los compuestos ensayados, con la excepción de **2.13 m** a concentración de 100 µM, mantienen aproximadamente el mismo rango de proliferación, tanto a concentraciones 10 como 100 µM. De manera que mediante este ensayo se comprueba la ausencia de toxicidad de los compuestos a las concentraciones ensayadas, excepto la de 100 µM para **2.13n**, la cual consideramos tóxica para linfocitos T y por tanto fue excluida en los ensayos de cuantificación de producción de citoquinas.

Para valorar el efecto de los compuestos sobre el perfil inflamatorio de células T, se realizaron ensayos de producción de citoquinas, tanto proinflamatorias (IL-17 e IFN- γ) como antiinflamatorias (IL-4 e IL-10) en células T de bazo.

La **figura 2.5** corresponde a las interleuquinas proinflamatorias IL-17 e IFN- γ . En ellas se observa como todos los productos ensayados, incluyendo tanto AICAR como A-769662 tienen propiedades inhibitorias de la inflamación a través de la disminución de la producción de estas citoquinas, siendo este efecto más acusado en el caso de IL-17.

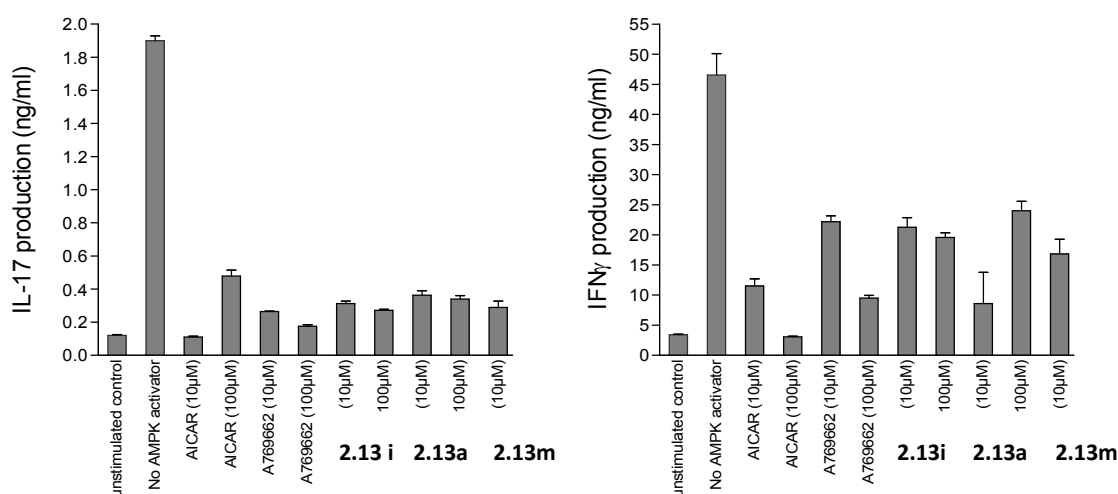


Figura 2.5. Ensayo de producción de citoquinas proinflamatorias IL-17 e IFN γ en células T de bazo mediada por estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de los activadores de AMPK. “Unstimulated control” corresponde a los valores mostrados por células en ausencia de anti-CD3/anti-CD28

Paralelamente se llevaron a cabo ensayos de cuantificación de dos citoquinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10. La **figura 2.6** recoge los resultados obtenidos. Como se puede observar, tanto en la producción de IL-10 como IL-4 se observa un acusado aumento en la producción de estas citoquinas tanto para el prototipo A-769662 como para el compuesto **2.13a**. Se pone de manifiesto un interesante perfil antiinflamatorio para estos dos compuestos, capaces de inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias, además de aportar un componente antiinflamatorio adicional por la producción de citoquinas antiinflamatorias.

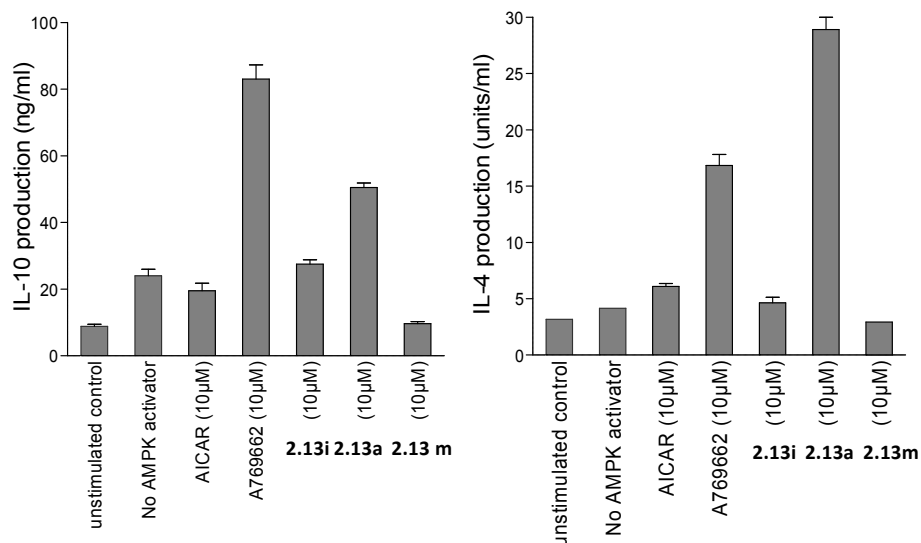


Figura 2.6. Ensayo de producción de citoquinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10 en células T de bazo mediada por estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de los activadores de AMPK. “Unstimulated control” corresponde a los valores mostrados por células en ausencia de anti-CD3/anti-CD28

2.3 Discusión

Este capítulo toma como punto de partida uno de los activadores de AMPK mejor contrastados, el prototipo de Abbott A-769662, con un doble objetivo, la síntesis de análogos estructuralmente relacionados y la exploración de nuevas acciones farmacológicas, en concreto el potencial antiinflamatorio.

Desde el punto de vista farmacológico, las modificaciones estructurales que se han realizado mantienen la actividad en el mismo orden de magnitud que el prototipo referencia, pero suponen un significativo incremento de la solubilidad termodinámica en algunos de los nuevos prototipos. A lo largo de la introducción se ha destacado que uno de los aspectos más relevantes para el desarrollo de nuevos moduladores de AMPK es la búsqueda de análogos selectivos frente a isoformas. Calabrese y col. en 2014 pusieron de manifiesto los distintos mecanismos moleculares de la regulación de AMPK a través de AMP o de A-769662 y su dependencia de la isoforma de la subunidad α^7 . Un año después, Scott y col. describieron el mecanismo de acción dependiente de isoforma de la dihidroxiquinolina **2.13 a**, preparada también por nosotros. Este trabajo reporta el sorprendente resultado de que se comporta simultáneamente como activador de los complejos que contienen la isoforma $\beta 1$ y como

inhibidor de los que contienen la $\beta 2$ ³⁰. Esto es coherente con los datos encontrados en nuestros estudios puesto que los ensayos enzimáticos, en los que se observa activación, se llevaron a cabo sobre complejos con $\beta 1$, y por otro lado puede ser una justificación de los efectos tan discretos que se han encontrado para los estudios de fosforilación en los cultivos celulares. Esta selectividad es una de las mejores herramientas en el desarrollo de candidatos a fármacos que aprovechen la distinta distribución y funcionamiento de las isoformas de AMPK. En el desarrollo de este trabajo, el descubrimiento de **2.13i** y **2.13m**, que pese a una menor actividad son mucho más solubles, puede suponer una ventaja de cara a mantener un perfil de selectividad similar a **2.13a** junto con un mejor perfil tipo fármaco.

A la vista de los ensayos realizados, la activación de AMPK ejercida por nuestros compuestos va acompañada de un efecto netamente antiinflamatorio, que se lleva a cabo a través de un mecanismo que implica la producción de agentes mediadores, concretamente las citoquinas ensayadas, siendo de especial relevancia el efecto sinérgico encontrado tanto para el prototipo de Abbott como para el derivado **2.13a** para la interleuquina IL-10 y la IL-4.

Estas interleuquinas desempeñan un importante papel en la iniciación y regulación de la respuesta inmune específica frente a antígenos, respuesta que es determinante para el control o desarrollo de ciertas enfermedades infecciosas y autoinmunes. Las interleuquinas pro- y antiinflamatorias están producidas por células diferentes: los linfocitos T cooperadores o “*helper*” (Th). Estos linfocitos se pueden clasificar en tres subtipos principales: Th1, Th2 y Th17, que se distinguen fenotípicamente por las citoquinas que producen. Los Th1 y Th17 poseen en general un efecto proinflamatorio ya que sintetizan interleuquinas que intervienen en la iniciación y progresión de diversos fenómenos inflamatorios como los que se dan en algunos procesos autoinmunes como esclerosis múltiple o artritis reumatoide. En el caso de Th1 este efecto está mediado en gran parte por el interferón γ (IFN γ) o el factor de necrosis tumoral α (TNF α) que secretan. Las células Th17 se caracterizan por la producción de IL-17 e IL-22 cuyo papel en inflamación está claramente establecido a través del reclutamiento de neutrófilos. Los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, algunas de las cuales como IL-4 o IL-13 están implicadas en patologías como asma y otras enfermedades alérgicas, mientras que actúan controlando la inflamación en muchos procesos autoinmunes. Es de destacar que IL-10, que también es producida por otros tipos celulares diferentes de linfocitos T, es una citoquina con potente actividad inmunosupresora³¹⁻³².

2.4 Conclusiones

Uno de los principales objetivos de este capítulo era mantener la buena capacidad de unión a AMPK del prototipo de Abbott, pero mejorando las propiedades de solubilidad. Esto se ha conseguido con las modificaciones estructurales que se han descrito. Este hecho puede constituir un punto de partida de futuros estudios, tales como la incidencia de estos compuestos en las rutas metabólicas en las que está involucrada esta proteína, las diferencias entre las isoformas, gracias a las peculiares propiedades de selectividad encontradas, o el diseño de futuros candidatos a fármaco a través de la interacción con esta diana.

Precisamente, esta interacción con AMPK del prototipo de Abbott se ha utilizado para el estudio de la vinculación entre el sistema inmune y el metabólico. Estudios que han puesto de manifiesto el efecto antiinflamatorio de la activación de AMPK. Este efecto está igualmente patente en nuestros compuestos, lo cual los convierte en puntos de partida interesantes para desarrollo de pruebas de eficacia en patologías de inflamación crónica mediada por IL-17 y/o IFN γ , como es el caso de procesos autoinmunes como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes, psoriasis o lupus eritematoso³³⁻³⁹. En muchos de estos procesos la producción de IL-4 es de especial relevancia debido a los efectos protectores que media para contener la inflamación. Como se ha dicho, IL-4 es una citoquina de acción pleiotrópica producida principalmente por linfocitos Th2 activados. A modo de ejemplo, en el sistema nervioso central, IL4 induce proliferación en células de la microglía, e inhibe la activación e induce la secreción del factor de crecimiento neuronal en astrocitos. Además, IL4 aumenta exponencialmente su producción durante daño cerebral, infección y procesos neurodegenerativos, de manera que agentes capaces de estimular su efecto antiinflamatorio pueden ser de especial importancia para el tratamiento de este tipo de procesos⁴⁰. Finalmente, y quizá aún más importante, es la capacidad de estos compuestos para estimular la producción de IL-10. Esta citoquina es clave para la contención de respuestas inmunes mediante múltiples mecanismos, como la estimulación de células supresoras de la actividad de linfocitos T efectores⁴¹⁻⁴², provenientes de la diferenciación de los linfocitos T precursores (*naive*) tras el reconocimiento del antígeno.

2.5. Procedimientos experimentales

2.5.1 Métodos generales

Los reactivos y disolventes se adquirieron de *Sigma-Aldrich Co.*, *Fluorochem* y *Acros Organics* y *Lab-Scan* y se usaron sin purificación.

La monitorización de las reacciones se ha efectuado por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice tipo 60 F₂₅₄ (Merck), de un espesor de capa de 0.2 mm, y visualización con luz ultravioleta (254 nm).

Las purificaciones mediante cromatografía en columna se realizaron usando sílice Merck 60, 230-400 *mesh*.

Los experimentos de HPLC-MS se han llevado a cabo empleando un cromatógrafo HPLC *Waters* 12695 conectado a un espectrómetro *Waters Micromass* ZQ. El gradiente de elución estándar es agua:acetonitrilo 85:15 → 5:95 con 0.1 % de ácido fórmico durante un tiempo de elución de 5 minutos y un flujo de 1 mL/min. Los gradientes diferentes se explicitan en cada caso.

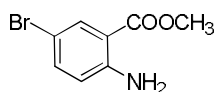
Los experimentos que involucraron compuestos sensibles al agua se realizaron bajo estrictas condiciones anhidras. La DMF anhidra se obtuvieron de fuentes comerciales (Aldrich).

Los experimentos de irradiación de microondas han sido realizados en un reactor de microondas monomodo *EmrysTM Synthesizer* (Biotage AB).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en el disolvente deuterado indicado en cada caso. Los espectros de ¹H y ¹³C fueron registrados en un espectrofotómetro Varian UNIT INOVA-300 (a 300 y 75 Hz), Varian UNITY-400 (a 400 y 100 Hz) y Varian 500 (a 500 y 125 Hz), respectivamente. Se obtuvieron en condiciones estándar. Se ha indicado en cada caso los desplazamientos químicos en la escala (ppm), la multiplicidad de las señales (s, single; d, doblete; t, triplete; q, cuartete; dd, doble doblete; ddd, doble doble doblete; pt, pseudo- triplete; dt, doble triplete; m, multiplete), el valor de las constantes de acoplamiento *J* (Hz) y la asignación estructural.

Los espectros de masas se han registrado en un espectrómetro *Hewlett-Packard* LC/MS HP 1100, mediante las técnicas de Impacto Electrónico o Electrospray.

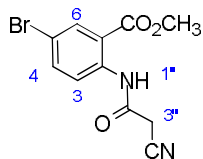
2.5.2 Procedimientos de síntesis

2-amino-5-bromobenzoato de metilo⁴³ (2.5)

A una disolución de antranilato de metilo (0.45 g, 3.00 mmol) en MeCN (15 mL) se añaden N-bromosuccinimida (0.56 g, 3.15 mmol) y NH₄OAc (23.12 mg, 0.30 mmol). La mezcla de reacción se agita a 70 °C durante 4 horas.

Una vez finalizada la reacción, el disolvente se evapora a vacío y el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 10:1). Se obtienen 0.61 g (88%) de sólido rojo. **P.f.** 65 – 68 °C (bibl. 68 – 70 °C). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.97 (m, 1H, H₆), 7.31 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H, H₄), 6.55 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H₃), 5.36 (s, 2H, NH₂), 4.04 (s, 3H, Me). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 167.3 (C=O), 149.5 (C₂), 136.8 (C₄), 133.6 (C₆), 118.6 (C₃), 112.6 (C₅), 107.6 (C₁), 61.0 (Me). **HPLC**: *t_R* = 6.45 (96%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 231.1 [M+H]⁺.

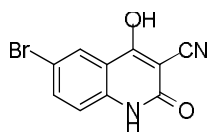
5-bromo-2-(2-cianoacetamido)benzoato de metilo (2.6)



A una suspensión de PCl₅ (679 mg, 3.26 mmol) en CH₂Cl₂ (7 mL), se le añade ácido cianoacético (277 mg, 3.26 mmol). La mezcla se agita a 60°C durante media hora. Transcurrido este tiempo, el crudo de reacción se deja enfriar a temperatura ambiente, se añade **2.5** (500 mg, 2.17 mmol) y se agita

durante una hora más a 60 °C. Una vez finalizada la reacción, el crudo se trata con 20 mL de agua. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtienen 480 mg (74 %) de un sólido blanco, que se usa en el siguiente paso de síntesis sin purificación adicional. **P.f.** 187 – 188 °C. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.62 (s, 1H, NH), 8.55 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H₃), 8.20 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H₆), 7.68 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H, H₄), 3.98 (s, 3H, Me), 3.59 (s, 2H, H₂"'). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.8 (C=O), 166.9 (C₂"'), 151.1 (C₂), 137.1 (C₄), 132.9 (C₆), 121.2 (C₃), 119.6 (C₄"'), 111.0 (C₅), 105.4 (C₁), 61.0 (Me), 52.4 (CH₂). **HPLC**: *t_R* = 5.70 (98 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 298.56 [M+H]⁺.

6-bromo-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbonitrilo (2.7a)

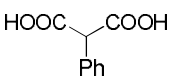


A una disolución de **2.6** (297.1 mg, 1.00 mmol) en THF (15 mL) se añade NaH (96 mg, 4.00 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 1.5 horas. Una vez finalizada la reacción, se evapora el disolvente a

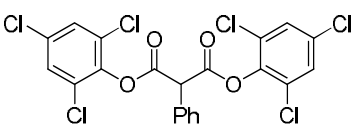
presión reducida. Tras esto, se añaden 20 mL de agua lentamente. La disolución se extrae con Et₂O (3 x 10 mL), y a continuación la fase acuosa se acidifica a con HCl 1 M precipitando un

sólido que se filtra y se lava con agua y Et₂O. Se obtienen 176 mg (66%) de un sólido beige. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.36 (s, 1H, OH), 8.05 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H5), 7.68 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H, H7), 7.56 (s, 1H, NH), 7.19 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H8). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 172.1 (C4), 162.7 (C2), 139.1 (C10), 135.0 (C7), 126.9 (C5), 119.4 (C9), 118.2 (C8), 117.9 (C6), 113.2 (C3), 84.5 (CN). **HPLC**: *t_R* = 2.50 (95 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 264.95 [M+H]⁺.

Ácido fenilmalónico²⁶ (2.8)

 A una disolución de KOH (1.19 g, 34.03 mmol) en agua (10 mL) se añade fenilmalonato de etilo (1.96 g, 8.30 mmol). La mezcla se agita a 90°C durante 3 horas. Una vez finalizada la reacción, el crudo se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se acidifica hasta pH = 2 mediante la adición de HCl 37% (m/m). La mezcla resultante se extrae con Et₂O (3 x 10 mL). La fase etérea se extrae con una disolución saturada de Na₂CO₃ en agua (3 x 10 mL). La nueva fase acuosa se vuelve a acidificar hasta pH = 2 con HCl 37% (m/m) y a extraer con Et₂O (3 x 20 mL). La fase etérea resultante se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtienen 1.3 g (86%) de un sólido blanco. **P. f.** 131-133 °C (bibl. 139-141 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.34 (m, 5H, H-Ar), 4.62 (s, 1H, H2). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 170.4 (COOH), 134.8 (C2), 130.0 (C-*m*), 128.9 (C-*o*), 127.2 (C-*p*), 58.2 (C2). **HPLC**: *t_R* = 1.16 (94 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 181.32 [M+H]⁺.

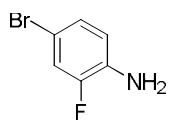
Fenilmalonato de 2,4,6-triclorofenilo²⁶ (2.9)

 A una suspensión de **2.8** (1.21 g, 6.72 mmol) en CH₂Cl₂ (30 mL) se añade una gota de DMF y cloruro de oxalilo (2.18 g, 17.20 mmol) lentamente. La mezcla se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añade 2,4,6-triclorofenol (3.61 g, 18.26 mmol), y se deja agitar a temperatura ambiente durante una noche. Una vez terminada la reacción, el disolvente se evapora a presión reducida y el residuo se tritura en MeOH (20 mL). Se obtienen 2.00 g (55%) de un sólido blanco. **P. f.** 110 - 112 °C (bibl. 97 - 98 °C). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.37 (s, 3H, H3''), 7.65 - 7.43 (m, 6H, Ph), 4.59 (s, 1H, H2). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 173.0 (C=O), 148.9 (C1''), 135.3 (C4''), 129.6 (C1'), 128.6 (C2''), 128.5 (C3''), 126.9 (C3'), 123.6 (C2'), 123.4 (H4'), 60.3 (C2). **HPLC**: El compuesto descompone en la columna de cromatografía.

Procedimiento general de síntesis de 4-bromoanilinas

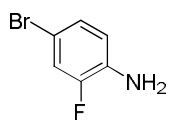
A una disolución de una anilina (500 mg, 1 eq.) en MeCN (5 mL) se añade N-bromosuccinimida (1.05 eq.) y NH_4OAc (10 %mol) en baño de hielo. Se agita a 0 °C durante el tiempo indicado en cada caso. Una vez finalizada la reacción, el disolvente se evapora a presión reducida. El residuo se disuelve en 30 mL de AcOEt y se extrae con H_2O (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 2:1), obteniéndose las bromoanilinas correspondientes.

4-bromo-2-cianoanilina⁴⁴ (2.10 b)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 4-bromoanilinas, el tiempo de reacción es de 5 minutos. Se obtienen 576 mg (35%) de un sólido rojo. **P.f.:** 93 – 95 °C (bibl. 94-95 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7.50 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H3), 7.40 (dd, J = 8.8, 2.3 Hz, 1H, H5), 6.65 (m, 2H, H6), 5.00 – 4.06 (s, 2H, NH_2). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 147.5 (C1), 136.00 (C5), 133.1 (C3), 115.7 (C6), 115.2 (CN), 107.7 (C4), 96.6 (C2). **HPLC:** t_R = 4.69. **EM** (ES, modo positivo) m/z 198.65[M+H]⁺.

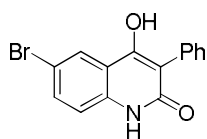
4-bromo-2-fluoranilina⁴⁵ (2.10 c)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 4-bromoanilinas, el tiempo de reacción es de 20 minutos. Se obtienen 445 mg (52%) de un sólido rojo. **P.f.** 36 – 38 °C (bibl. 40 – 41 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7.15 (dd, J = 10.5, 2.2 Hz, 1H, H3), 7.05 (ddd, J = 8.4, 2.1, 1.2 Hz, 1H, H5), 6.70 (dd, J = 9.3, 8.5 Hz, 1H H6), 3.70 (s, 2H, NH_2). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 151.8 (d, J = 241.5 Hz, C2), 134.2 (d, J = 12.8 Hz, C1), 127.8 (d, J = 3.8 Hz, C5), 119.1 (d, J = 21.8 Hz, C3), 118.1 (d, J = 3.8 Hz, C6), 109.36 (d, J = 8.3 Hz, C4). **HPLC:** t_R = 2.76. **EM** (ES, modo positivo) m/z 189.8 [M+H]⁺.

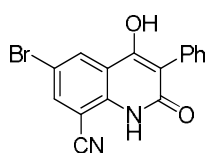
Procedimiento general de síntesis de las 6-bromo-3-fenil-4-hidroxiquinolin-2(1H)-onas.

Una mezcla de la 4-bromoanilina correspondiente (1 eq) y **2.9** (2 eq.) se calienta a 248 °C durante 17 minutos bajo irradiación de microondas. El crudo de reacción se tritura en Et_2O , precipitando un sólido que se filtra y se lava con Et_2O frío.

6-bromo-3-fenil-4-hidroxiquinolin-2(1H)-ona (2.7 b)

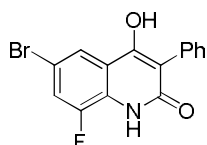
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de las 6-bromo-3-fenil-4-hidroxiquinolin-2(1H)-onas, se partió de 330 mg (1.91 mmol) de 4-bromoanilina y se obtuvieron 470 mg (76%) de un sólido beige. **P. f.** > 300

°C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.60 (s, 1H, OH), 10.31 (s, 1H, NH), 8.08 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H5), 7.68 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H, H7), 7.43 – 7.32 (m, 5H, Ph), 7.26 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H8). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 162.8 (C4), 156.5 (C2), 137.4 (C10), 133.4, 133.2, 131.4, 128.0, 127.4, 125.6, 117.6, 117.5 (C9), 114.0 (C8), 113.2 (C3). **HPLC**: *t_R* = 4.38. **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 316.35 [M+H]⁺.

6-bromo-3-fenil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-8-carbonitrilo (2.7 c)

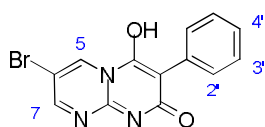
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de las 6-bromo-3-fenil-4-hidroxiquinolin-2(1H)-onas, se partió de 100 mg (0.51 mmol) de **2.10 b** y se obtuvieron 78 mg (45%) de un sólido beige. **P. f.** 249 °C. **¹H RMN** (300 MHz,

DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.32 (s, 1H, OH), 7.65 (s, 1H, NH), 7.63 (m, 1H, H5), 7.60 (m, 1H, H7), 7.45 – 7.32 (m, 5H, Ph). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 169.8 (C4), 165.8 (C2), 139.8, 137.6, 134.6, 133.4, 130.0, 128.7, 122.7, 116.7, 114.8, 103.9. **HPLC**: *t_R* = 4.38 (97%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 199.3 [M+H]⁺.

6-bromo-3-fenil-8-fluor-4-hidroxiquinolin-2(1H)-ona (2.7 d)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de las 6-bromo-3-fenil-4-hidroxiquinolin-2(1H)-onas, se partió de 220 mg (1.158 mmol) de **2.10 c** y se obtuvieron 160 mg (76%) de un sólido anaranjado. **P. f.** > 300 °C. **¹H RMN**

(300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.65 (s, 1H, OH), 10.50 (s, 1H, NH), 7.93 (m, 1H, H5), 7.74 (dd, *J* = 10.2, 2.1 Hz, 1H, H7), 7.40 (m, 5H, Ph). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 162.5 (C4), 156.2 (C2), 133.0 (d, *J* = 16.0 Hz, C10), 131.4 (d, *J* = 9.1 Hz, C6), 128.5, 128.1, 127.6, 126.7, 121.7 (d, *J* = 22.0 Hz, C7), 119.3 (d, *J* = 4.3 Hz, C5), 119.0 (d, *J* = 8.8 Hz, C9), 115.0 (d, *J* = 216.9 Hz, C8), 111.8 (C3). **HPLC**: *t_R* = 4.40 (97%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 334.2 [M+2H]⁺.

7-bromo-3-fenil-4-hidroxi-2H-pirimido[1,2-*a*]-pirimidin-2-ona (2.7 e)

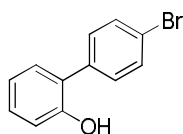
Se disuelven 2-amino-5-bromopirimidina (100 mg, 0.56 mmol) y **2.9**

(452.78 mg, 0.84 mmol) en 4 mL de THF anhidro. La mezcla se calienta a 200 °C durante 10 min. bajo irradiación de microondas. Una vez

terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo seco se tritura

en DCM. Se filtra el precipitado formado, resultando 150 mg (84 %) de un sólido naranja. **P.f.** 217 °C **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.79 (s, 1H, OH), 9.39 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H5), 9.23 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H7), 7.68 - 18 (m, 5H, Ph). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 165.0 (C2), 148.1 (C-4), 138.5 (C9), 134.3 (C7), 131.0 (C5), 130.7 (C1'), 128.5 (C2'), 127.7 (C3'), 127.5 (C4'), 126.1 (C6), 107.6 (C3). **HPLC:** *t*_R = 3.83 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 320.5 [M+2H]⁺.

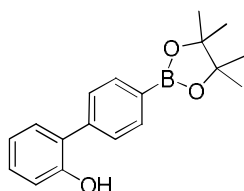
4'-bromo-1,1'-bifenil-2-ol⁴⁶ (2.11)



A una disolución de ácido 2-hidroxibencenoborónico (284.4 mg, 2.00 mmol) y 2-bromo-4-iodobenceno (565.82 mg, 2.00 mmol) en 1,4-dioxano (15 mL) se añaden Pd(PPh₃)₄ (57.78 mg, 0.05 mmol) y una disolución 2M de K₃PO₄ (1.56 mL, 3.11 mmol). La mezcla de reacción se agita a 115 °C bajo atmósfera de N₂

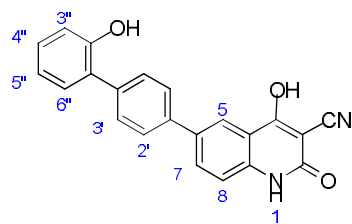
durante 2h. Una vez finalizada la reacción, se evapora el disolvente a presión reducida y se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 10:1), resultando 439 mg (88%) de un aceite amarillo. **P.f.** 50 °C (bibl. 60 °C). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.62 (m, 2H, H-Ar), 7.38 (m, 2H, H-Ar), 7.25 (m, 2H, H-Ar), 6.99 (m, 2H, H-Ar), 5.10 (s, 1H, OH). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 152.4 (C-OH), 136.3, 132.3, 130.9, 130.3, 129.5, 127.2, 122.0, 121.2, 116.2. **HPLC:** *t*_R = 3.65 (96 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 248.56 [M+H]⁺.

4'-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-bifenil-2-ol⁴⁷ (2.12)



Se disuelven bis(pinacolato)diboro (760 mg, 3.00 mmol), **2.11** (670 mg, 2.68 mmol), 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno)dicloropaladio (II) (48.24 mg, 2.5 %mol) y acetato potásico (799.1 mg, 8.14 mmol) en 1,4-dioxano (5 mL). La mezcla se calienta a 150 °C durante 10 minutos bajo

irradiación de microondas. Una vez finalizada la reacción, el crudo se filtra sobre celita y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 4:1), resultando 660 mg (83 %) de un sólido blanco. **P.f.** 148 °C. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.94 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H3'), 7.50 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H2'), 7.27 (m, 2H, H-Ar), 7.01 (m, 2H, H-Ar), 5.39 (s, 1H, OH), 1.38 (s, 12H, Me). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 152.9 (C-OH), 140.4, 136.0, 130.6, 129.7, 128.8, 128.4, 122.1, 121.2, 116.3, 84.3 (C3''), 25.3 (Me). **HPLC:** El compuesto descompone en la columna de cromatografía.

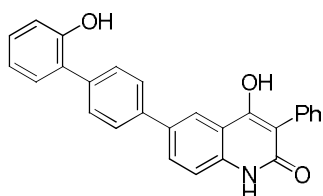
4-hidroxi-6-[2'-hidroxi(1,1'-bifenil)-4-il]-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbonitrilo³⁰ (2.13 a)

Una disolución de **2.7 a** (60 mg, 0.23 mmol), **2.11** (100 mg, 0.34 mmol), Pd(PPh₃)₄ (5.4 mg, 2 %mol) y Cs₂CO₃ (151 mg, 0.46 mmol) en la mezcla de disolventes 1,4-dioxano:tolueno:EtOH:H₂O 10:1:3:6 (20 mL) se agita a 100 °C durante 8 horas bajo atmósfera de N₂. Una vez terminada la

reacción, se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo se disuelve en agua (10 mL) y se extrae con AcOEt (3x5 mL). La fase acuosa se acidifica con HCl 37% (m/m) hasta pH = 2, apareciendo un precipitado que se filtra y lava con agua y Et₂O, obteniéndose 20 mg (25%) de un sólido blanco. **P. f.** >300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.78 (s, 1H), 9.63 (s, 1H), 8.36 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H5), 8.02 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H, H7), 7.69 (m, 4H, H-Ar), 7.28 (m, 3H, H-Ar), 6.91 (m, 2H, H-Ar). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.6 (C4), 161.4 (C2), 154.7 (C2'), 139.3, 138.1, 137.2, 133.9, 132.2, 130.5, 130.0, 127.4, 126.3, 121.7, 119.9, 117.1, 116.4, 115.9, 115.1 (CN), 86.6 (C3). **HPLC**: *t_R* = 1.18 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 355.65 [M+H]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₂₂H₁₄N₂O₃: C 74.57, H 3.98, N 7.91. Medido: C 75.01, H 4.02, N 8.12.

Procedimiento general de síntesis de 3-fenil-4-hidroxi-6-[2'-hidroxi-(1,1'-bifenil)-4-il]quinolin-2(1H)-onas.

A una disolución de la correspondiente 6-bromo-3-fenil-4-hidroxiquinolin-2(1H)-ona (50 mg) en la mezcla de disolventes 1,4-dioxano:MePh:EtOH:H₂O 10:1:3:6 (20 mL) se añade K₂CO₃ (19.35 mg, 0.14 mmol), Pd(PPh₃)₄ (2.54 mg, 2 %mol) y **2.12** (33 mg, 0.11 mmol). La mezcla resultante se agita bajo irradiación de microondas a 120 °C durante 1h 15 min. Una vez finalizada la reacción el crudo se procesa según se indica en cada caso.

3-fenil-4-hidroxi-6-[2'-hidroxi-(1,1'-bifenil)-4-il]quinolin-2(1H)-ona (2.13 b)

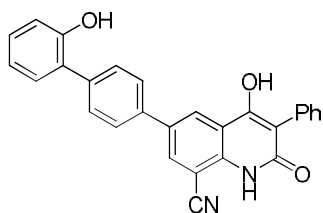
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-fenil-4-hidroxi-6-[2'-hidroxi-(1,1'-bifenil)-4-il]quinolin-2(1H)-onas, una vez finalizada la reacción, se evapora el disolvente del crudo de reacción a presión reducida. El residuo se disuelve en agua y se

extrae con AcOEt (3 x 15 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM:MeOH 50:1), obteniéndose 20 mg (14%) de un sólido blanco. **P. f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.52 (s, 1H, OH), 9.61 (s, 1H, OH), 8.31 (s, 1H, NH), 7.90 – 7.87 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H, H7), 7.73 (d, *J* =

9.0 Hz, 2H, H3'), 7.65 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H2'), 7.40 – 7.28 (m, 8H, H-Ar), 7.16 (dt, $J = 7.6, 1.8$ Hz, 1H, H8), 6.91 (m, 2H, H-Ar). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 163.0 (C4), 158.2 (C2), 154.7 (C2''), 138.0 (C10), 137.8, 137.7, 134.0, 133.2, 131.5, 130.5, 130.0, 129.3, 128.9, 127.9, 127.5, 127.0, 126.2, 121.0, 119.8, 116.4, 116.4 (C-Ar), 116.0 (C8), 113.1 (C3). **HPLC**: $t_R = 4.58$ (90%). **EM** (ES, modo positivo): m/z 406.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HRMS** (ES, modo positivo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{NO}_3$ 406.1438; encontrado: 406.1437.

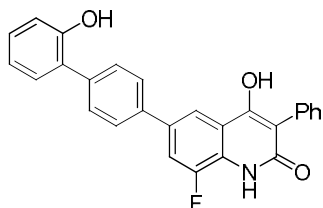
3-fenil-4-hidroxi-6-[2'-hidroxi-(1,1'-bifenil)-4-il]-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-8-carbonitrilo

(2.13 c)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-fenil-4-hidroxi-6-[2'-hidroxi-(1,1'-bifenil)-4-il]quinolin-2(1H)-onas, una vez terminada la reacción, se evapora el disolvente del crudo a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM:MeOH 40:1), obteniéndose 10 mg (7%) de sólido blanco. **P. f.**: 178 – 180 °C. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.50 (s, 1H), 9.67 (s, 1H), 8.22 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H5), 8.09 (dd, $J = 2.4, 8.7$ Hz, 1H, H7), 7.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H3'), 7.53 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H2'), 7.47 – 7.29 (m, 5H, H-Ar), 7.24 (dt, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H, H-Ar), 7.04 – 6.93 (m, 3H, H-Ar). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 170.0 (C5), 159.5 (C2), 154.7 (C2''), 138.7, 137.5, 135.9, 135.8, 131.9, 131.1, 130.5, 130.0, 129.5, 129.0, 128.7, 127.3, 127.0, 126.5, 126.1, 119.8, 117.1, 116.4 (C8), 107.9 (C3). **HPLC**: $t_R = 4.87$ (95 %). **Análisis elemental**: Calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$: C 78.13, H 4.21, N 6.51. Medido: C 78.65, H 4.66, N 6.62.

3-fenil-8-fluor-4-hidroxi-6-[2'-hidroxi-(1,1'-bifenil)-4-il]quinolin-2(1H)-ona (2.13 d)



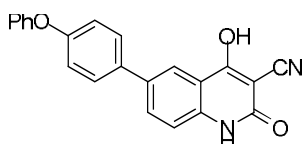
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-fenil-4-hidroxi-6-[2'-hidroxi-(1,1'-bifenil)-4-il]quinolin-2(1H)-onas, una vez terminada la reacción, el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM:MeOH 40:1), obteniendo 2.6 mg (2%) de un sólido beige. **P. f.** > 300 °C. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.04 (s, 1H), 9.59 (s, 1H), 7.97 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, H5), 7.71 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H3'), 7.62 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H2'), 7.53 (dt, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1H, H-Ar), 7.36 – 7.22 (m, 6H, H-Ar), 7.16 (dt, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1H, H-Ar), 6.90 (m, 2H, H-Ar). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 162.3 (C4), 157.2 (C2), 135.3 (d, $J = 18.2$ Hz, C10), 133.1 (d, $J = 9.5$ Hz, C6), 132.0, 127.3, 127.2, 125.7, 125.44, 124.9, 124.8, 124.6, 124.5, 123.8, 123.6, 123.5, 123.3, 123.2, 123.0, 122.8, 122.6, 122.5, 112.4 (d, $J = 221.1$ Hz, C8), **HPLC**: $t_R = 4.76$ (93%). **EM**

(ES, modo positivo): m/z 424.6 $[M+H]^+$. **HRMS** (ES, modo positivo) calculado para $C_{27}H_{18}FNO_3$ 423.4351; encontrado: 423.3477.

Procedimiento general de síntesis de 6-fenil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolina-3-carbonitrilos

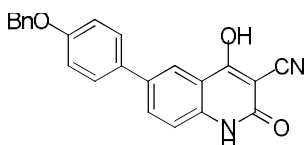
A una disolución de **2.7 a** (100 mg, 0.38 mmol) en la mezcla de disolventes 1,4-dioxano:MePh:EtOH:H₂O (15 mL) se añade Cs₂CO₃ (250.12 mg, 0.76 mmol), Pd(PPh₃)₄ (8.87 mg, 0.0076 mmol) y el ácido fenilborónico correspondiente en cada caso (1.5 eq.). La mezcla de reacción se calienta a 100 °C durante 12 h. Una vez finalizada se procesa según se indica en cada caso.

[6-(4-fenoxifenilo)-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbonitrilo] (**2.13 e**)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 6-fenil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolina-3-carbonitrilos, una vez terminada la reacción, se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM:MeOH 30:1), obteniéndose 12 mg (8%) de un sólido blanco. **P. f.** > 300 °C. **¹H RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.15 (s, 1H, NH), 8.03 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H5), 7.64 (m, 3H, H-Ar), 7.39 (m, 2H, H-Ar), 7.08 (m, 6H, H-Ar). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 177.7 (C4), 165.6 (C2), 157.6 (C4'), 156.6 (C1'), 140.0, 136.4, 133.7, 131.9, 131.0, 129.8, 128.6, 124.4, 123.1, 122.3, 119.9, 119.6 (CN), 116.5 (C3). **HPLC**: t_R = 4.71 (83%). **EM** (ES, modo positivo): m/z 355.6 $[M + H]^+$. **HRMS** (ES, modo positivo) calculado para $C_{22}H_{15}N_2O_3$ 355.1077; encontrado: 355.1080.

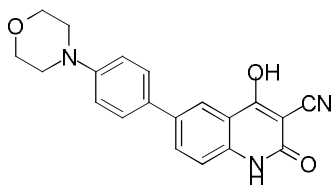
6-(4-benciloxifenil)-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbonitrilo (**2.13 g**)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 6-fenil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolina-3-carbonitrilos, una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se tritura con MeOH (20 mL) y el sólido obtenido se filtra y se lava con CH₂Cl₂. Se obtienen 104.5 mg (74%) de sólido gris. **P. f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.08 (s, 1H, NH), 7.98 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H5), 7.59 (dd, J = 2.3, 8.4 Hz, 1H, H7), 7.55 (m, 2H, H3'), 7.48 (d, J = 7.0 Hz, 2H, H3''), 7.40 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H4''), 7.34 (m, 1H, H5''), 7.09 (m, 3H, H8 + H2'), 5.14 (s, 2H, CH₂). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 176.7 (C4), 164.7 (C2), 157.4 (C4'), 138.8 (C10), 137.1 (C2''), 132.9 (C6), 131.2 (C7), 128.6 (C1'), 128.4 (C4''), 127.8 (C5''), 127.7 (C3''), 127.1 (C3'), 121.8 (C5), 121.5 (C9), 115.5 (C8), 115.2 (C2' + CN), 80.1 (C3), 69.2 (CH₂). **HPLC**: t_R = 4.65

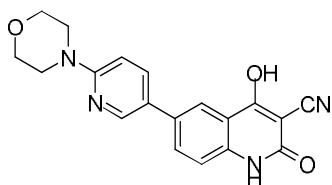
(99.9 %). **HRMS** (ES, modo positivo) calculado para $C_{23}H_{17}N_2O_3$ 369.3921; encontrado: 369.1204.

4-hidroxi-6-(4-(morfolinifenil)-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbonitrilo (2.13 i)



Seguendo el procedimiento general de síntesis de 6-fenil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolina-3-carbonitrilos, una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se tritura con agua, se filtra y se lava con Et_2O . Se obtuvieron 42 mg (32%) de sólido naranja. **P. f.** > 300 °C. **1H RMN** (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 10.03 (s, 1H, OH), 8.30 (s, 1H, NH), 7.97 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H5), 7.58 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H, H7), 7.49 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H3'), 7.07 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H8), 7.00 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H2'), 3.74 (t, J = 4.8 Hz, 4H, H3''), 3.12 (t, J = 4.8 Hz, 4H, H2''). **^{13}C RMN** (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 177.2 (C4), 165.0 (C2), 158.9 (C4'), 150.4 (C9), 138.9 (C6), 131.8 (C1'), 131.3 (C5), 128.7 (C7), 126.9 (C2'), 121.8 (C10), 115.8 (C8 + C3'), 115.7 (C8), 79.4 (CN), 66.4 (C3''), 48.7 (C2''). **HPLC**: t_R = 7.86 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo): m/z 349.5 $[M+2H]^+$. **HRMS** (ES, modo positivo) calculado para $C_{20}H_{18}N_3O_3$ 348.1343; encontrado: 348.1342.

4-hidroxi-6-(6-morfolinipiridin-3-il)-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbonitrilo (2.13 k)



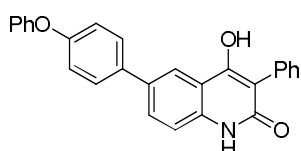
Una disolución de Cs_2CO_3 (250.12 mg, 0.76 mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (8.80 mg, 0.0076 mmol), el éster pinacolínico del ácido 6-(morfolinipiridin-3-il)borónico (169.2 mg, 0.56 mmol) y **2.7 a** (100 mg, 0.36 mmol) en la mezcla de disolventes 1,4-dioxano:tolueno:EtOH:H₂O 10:1:3:6 (5 mL) se agita bajo irradiación de microondas a 120 °C durante 1 h 15 min. Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se disuelve en agua y se extrae con AcOEt (3 x 20 mL). A la fase acuosa se añade NaCl hasta saturación y se extrae con THF (3 x 20 mL). De la fase orgánica resultante se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose 25 mg (19 %) de sólido anaranjado. **P. f.** > 300 °C. **1H RMN** (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 10.16 (s, 1H, OH), 8.40 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H5), 7.96 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H2''), 7.80 (dd, J = 8.7, 2.6 Hz, 1H, H6'), 7.59 (dd, J = 8.4, 2.3 Hz, 1H, H7), 7.12 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H5'), 6.89 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H8), 6.55 (s, 1H, NH), 3.69 (t, J = 4.7 Hz, 4H, H3''), 3.44 (t, J = 4.7 Hz, 4H, H2''). **^{13}C RMN** (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 177.1 (C4), 165.0 (C2), 158.4 (C4'), 145.2 (C2'), 139.2 (C9), 135.7 (C6'), 129.4 (C6), 128.7 (C7), 125.9 (C5), 121.8 (C1'), 121.7 (C8), 121.6 (C10), 116.0 (CN), 107.4 (C5'), 80.7 (C3), 66.3 (C3''), 45.6 (C2''). **HPLC**: t_R = 1.72

(99.9%). **EM** (ES, modo positivo): m/z 349.5 $[M+H]^+$. **HRMS** (ES, modo positivo) calculado para $C_{19}H_{17}N_4O_3$ 349.1295; encontrado: 349.1280.

Procedimiento general para la síntesis de 6-aryl-3-fenil-4-hidroxiquinolin-2(1H)-onas.

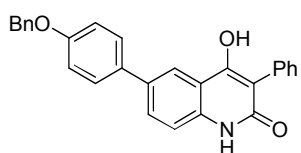
A una disolución de **2.7 b** (50 mg, 0.16 mmol) en la mezcla de disolventes 1,4-dioxano:tolueno:EtOH:H₂O 10:1:3:6 (20 mL) se añade Cs₂CO₃ (104.25 mg, 0.32 mmol), Pd(PPh₃)₄ (3.7 mg, 0.0032 mmol) y el ácido fenilborónico correspondiente en cada caso (1.5 eq.). La disolución resultante se agita a 100 °C bajo atmósfera de N₂ durante el tiempo indicado en cada caso. Una vez finalizada la reacción los crudos obtenidos se procesan según se indica en cada caso.

3-fenil-6-(4-fenoxifenil)-4-hidroxiquinolin-2(1H)-ona (2.13 f)



Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 6-aryl-3-fenil-4-hidroxiquinolin-2(1H)-onas, la disolución se agita durante 9h. El crudo de reacción se concentra a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM:MeOH 30:1), obteniéndose 8 mg (12%) de sólido blanco. **P. f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.57 (s, 1H, OH), 10.24 (s, 1H, NH), 8.23 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H5), 7.83 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H, H7), 7.72 (dt, J = 8.7, 2.4 Hz, 2H, H-Ar), 7.39 (m, 9H, H-Ar), 7.08 (m, 4H, H-Ar). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 162.9 (C4), 157.6 (C2), 156.9 (C4'), 156.4 (C1''), 137.6 (C10), 135.3, 133.7, 132.8, 131.5, 130.4, 129.3, 128.4, 128.0, 127.2, 123.9, 121.4, 120.8, 119.4, 119.0, 116.0, 113.4 (C3). **HPLC**: t_R = 5.38 (89%). **EM** (ES, modo positivo): m/z 406.5 $[M+H]^+$. **HRMS** (ES, modo positivo) calculado para C₂₇H₂₀NO₃ 406.1438; encontrado: 406.1452.

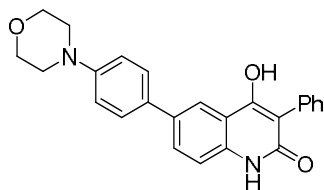
6-(4-benciloxi)fenil]-3-fenil-4-hidroxiquinolin-2(1H)-ona (2.13 h)



Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 6-aryl-3-fenil-4-hidroxiquinolin-2(1H)-onas, la disolución se agita durante 8 horas. El crudo de reacción se concentra a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM:MeOH 20:1), obteniéndose 40 mg (59%) de sólido blanco. **P. f.**: 279 - 281 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.52 (s, 1H, NH), 8.20 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H5), 7.79 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H, H7), 7.63 (dt, J = 9.5, 2.7 Hz, 2H, H-Ar), 7.46 - 7.30 (m, 11H, H-Ar), 7.11 (dt, J = 6.5, 2.2 Hz, 2H, H-Ar), 5.15 (s, 2H, CH₂). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 162.9 (C4), 158.1 (C2), 157.8 (C4'), 137.4 (C10), 137.3 (CH₂), 133.8, 133.1, 132.6, 131.5, 129.1, 128.8, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.1, 120.4, 116.1, 115.9,

115.7 (C8), 113.2 (C3), 69.6 (CH₂). **HPLC**: t_R = 5.67 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo): m/z 420.6 [M+H]⁺. **HRMS** (ES, modo positivo) calculado para C₂₈H₂₂NO₃ 420.1600; encontrado: 420.4712.

3-fenil-4-hidroxi-6-(4-morfolinfenil)quinolin-2(1H)-ona (2.13 j)

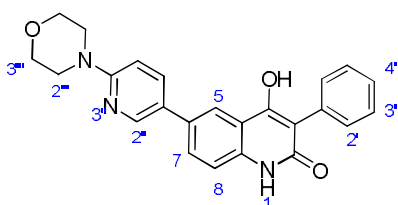


Siguiendo el procedimiento general para la síntesis de 6-aril-3-fenil-4-hidroxiquinolin-2(1H)-onas, la disolución se agita durante 12 h. Una vez finalizada la reacción, el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía en

columna sobre gel de sílice (DCM:MeOH 20:1). Se obtienen 15 mg (23%) de sólido anaranjado.

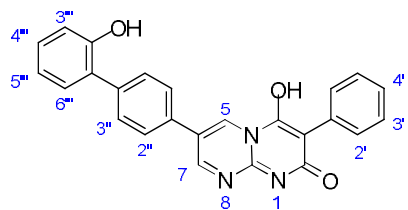
P. f. > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.50 (s, 1H), 8.20 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H5), 7.80 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H, H7), 7.60 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H3'), 7.40 – 7.30 (m, 6H, H-Ar), 7.04 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H2'), 3.76 (t, J = 4.5 Hz, 4H, H3''), 3.15 (t, J = 4.5 Hz, 4H, H2''). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 162.9 (C4), 157.8 (C2), 150.6, 137.1, 133.8, 133.3, 131.5, 130.5, 128.9, 127.9, 127.2, 127.1, 119.9, 116.0, 115.9, 115.7, 113.2 (C3), 66.4 (C3''), 48.6 (C2''). **HPLC**: t_R = 4.15 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo): m/z 399.3 [M+H]⁺. **HRMS** (ES, modo positivo) calculado para C₂₅H₂₃N₂O₃ 399.1703; encontrado: 399.1694.

3-fenil-4-hidroxi-6-[6-(N-morfolin)piridin-3-il]quinolin-2(1H)-ona (2.13 l)



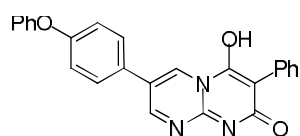
A una disolución de **2.7 b** (52 mg, 0.16 mmol) en la mezcla de disolventes 1,4-dioxano:MePh:EtOH:H₂O 10:1:3:6 (50 mL) se añade K₂CO₃ (45.3 mg, 0.33 mmol), Pd(PPh₃)₄ (5.8 mg, 5 %mol) y 4-(5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridin-2-il)morfolina (73.8 mg, 0.25 mmol). La disolución se

agita a 120 °C bajo irradiación de microondas durante 20 minutos. Una vez terminada la reacción, el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM:MeOH 20:1), resultando 30 mg (45%) de sólido anaranjado. **P. f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.52 (s, 1H, NH), 8.52 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H5), 8.20 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H2'), 7.92 (dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H, H6'), 7.82 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H, H7), 7.41 – 7.31 (m, 6H), 6.95 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H5'), 3.72 (t, J = 4.8 Hz, 4H, H3''), 3.49 (t, J = 4.7 Hz, 4H, H2''). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 162.7 (C4), 158.7 (C2), 157.6, 145.5, 137.3, 135.9, 133.8, 131.5, 130.9, 128.7, 127.9, 127.1, 125.3, 119.9, 116.1, 116.1, 113.3, 107.4 (C3), 66.3 (C3''), 45.5 (C2''). **HPLC**: t_R = 2.73 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo): m/z 400.4 [M+H]⁺. **HRMS** (ES, modo positivo) calculado para C₂₄H₂₂N₃O₃ 400.1656; encontrado: 400.1639.

3-fenil-4-hidroxi-7-[2'-hidroxi-(1,1'-bifenil)-4-il]-2H-pirimido[1,2-a]pirimidin-2-ona (2.13 m)

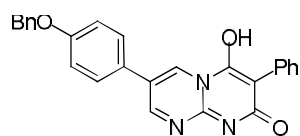
A una disolución de **2.7 e** (50 mg, 0.16 mmol) en 1,4-dioxano:MeOH 5:1 (5 mL) se añaden **2.12** (70 mg, 0.24 mmol), Pd(PPh₃)₄ (3.67 mg, 0.003 mmol) y Cs₂CO₃ (103.34 mg, 0.31 mmol), este último disuelto en la mínima cantidad posible de agua. La mezcla se agita a 120 °C

durante 1.5 h bajo irradiación de microondas. Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se tritura en EtOH. Se filtra el sólido resultante, y las aguas de filtrado se tratan con 2 mL de hexano en frío. El precipitado resultante se filtra, originando 38 mg (59 %) de un sólido naranja. **P.f.** 278 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 9.18 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 9.09 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.78 – 7.67 (m, 4H), 7.28 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.19 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.12 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.00 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.80 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 158.9 (C2), 156.2 (C4), 155.3 (C2'), 154.7 (C7), 150.0 (C9), 139.4 (C4''), 131.6 (C1'), 130.4 (C1''), 130.2 (C4'''), 130.1 (C3''), 130.0 (C1''' + C6'''), 129.7 (C2'), 129.0 (C3'), 128.9 (C4'), 127.4 (C2''), 125.8 (C5'''), 125.3 (C6), 125.3 (C5), 116.3 (C3'''), 103.9 (C3). **HPLC**: *t_R* = 4.10 (98%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 408.2 [M+H]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₂₅H₁₇N₃O₃: C 73.70, H 4.21, N 10.31. Medido: C 73.37, H 4.69, N 9.89.

3-fenil-6-(4-fenoxifenil)-4-hidroxi-2H-pirimido[1,2-a]pirimidin-2-ona (2.13 n)

Se disuelven **2.7 e** (70 mg, 0.22 mmol), ácido 4-fenoxi-fenilborónico (70.63 mg, 0.33 mmol), Cs₂CO₃ (144.18 mg, 0.44 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (5.14 mg, 0.004 mmol) en la mezcla de disolventes 1,4-dioxano:tolueno:EtOH:H₂O 10:1:3:6 (50 mL) y la mezcla se agita en atmósfera inerte de N₂ a 100 °C durante una noche. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM:MeOH 100:1), resultando 43 mg (47 %) de un sólido naranja. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 9.36 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H5), 9.30 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H7), 7.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H3''), 7.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H2''), 7.43 (m, 2H, H-Ar), 7.28 (m, 2H, H-Ar), 7.12 (m, 6H, H-Ar). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 162.2 (C4''), 157.8 (C2), 156.4 (C4), 155.4 (C1'''), 148.6 (C7), 136.5 (C9), 134.0 (C1'), 130.9 (C1''), 130.6 (C3'''), 128.7 (C2'), 127.9 (C3'), 127.2 (C4'), 125.3 (C2''), 124.4 (C4'''), 124.0 (C6), 119.5 (C5), 119.4 (C2'''), 117.5 (C3''), 99.4 (C3). **HPLC**: *t_R* = 4.68 (99%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 408.3 [M-H]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₂₅H₁₇N₃O₃: C 73.70, H 4.21, N 10.31. Medido: C 74.12, H 4.10, N 10.11.

6-(4-benciloxifenil)-3-fenil-4-hidroxi-2H-pirimido[1,2-a]pirimidin-2-ona (2.13 o)



Se disuelve **2.12** (70 mg, 0.22 mmol), ácido 4-benciloxifenilborónico (75.26 mg, 0.33 mmol), Cs₂CO₃ (144.18 mg, 0.44 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (5.14 mg, 0.004 mmol) en la mezcla de disolventes 1,4-dioxano:tolueno:EtOH:H₂O 10:1:3:6 (50 mL) y se agitan en atmósfera inerte de N₂ a 100 °C durante una noche. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM:MeOH 100:1), resultando 30 mg (32 %) de un sólido naranja . **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 9.36 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H5), 9.28 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H7), 7.75 (dd, *J* = 10.9, 8.5 Hz, 4H, H2''+H3''), 7.56 – 7.03 (m, 10H, H-Ar), 5.18 (s, 2H, CH₂). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 162.2 (C4''), 159.2 (C2), 155.4 (C4), 148.5 (C2'''), 137.2 (C7), 136.0 (C9), 133.5 (C1'), 130.9 (C1''), 129.4 (C4'''), 128.8 (C2'), 128.3 (C3'), 128.2 (C4'), 128.0 (C2''), 128.0 (C5'''), 127.2 (C6), 125.4 (C5), 123.3 (C3'''), 116.1 (C3''), 95.4 (C3), 69.7 (CH₂). **HPLC**: *t_R* = 4.71 (97%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 422.3 [M+H]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₂₆H₁₉N₃O₃: C 74.10, H 4.54, N 9.97. Medido: C 74.53, H 4.63, N 9.69.

2.5.3 Ensayos in vitro de activación de AMPK

La actividad de la enzima AMPK en los ensayos de activación *in vitro* se evaluó usando una metodología basada en tecnología *Delfia*⁴⁸. Las actividades de la enzima se midieron en placas microtituladoras en presencia de un péptido sustrato sintético (AMARAASAAALARRR, o péptido "AMARA") y activadores en diluciones en serie. Las reacciones se iniciaron a través de la adición de AMPK. La actividad de la enzima se mide usando un anticuerpo anti-fosfoserina para medir la cantidad de fosfato incorporado a "AMARA". Buffer de reacción: Hepes 50 mM; pH=7.4; [ATP]=125mM; [MgCl₂]=19mM; Incubación de 30 min. a 30 °C.

2.5.4 Medidas de la activación en células de AMPK

La línea celular utilizada para los tratamientos con los 15 diferentes reactivos ensayados fue HEK293T (células embrionarias de riñón humano). Las células crecieron en medio DMEM

(*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con 25 mM de glucosa suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado, 2 mM glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina en una atmósfera húmeda a 37°C con un 5% de CO₂. Las células se sembraron en placas de 60 mm (p.60) para obtener un 70-80% de confluencia y se lavaron en tampón *Krebs Ringer* (KRB: NaCl 12,5 mM, CaCl₂ 15 mM, KH₂PO₄ 0,5 mM, KCl 3 mM, NaHCO₃ 2,5 mM, MgSO₄ 0,5 mM, HEPES 10 mM pH 7,4, 95:5 O₂ /CO₂) a 37°C. A continuación, se trataron durante 1 h a 37°C en la estufa de cultivos, añadiendo a cada una de ellas las cantidades adecuadas de los compuestos a estudiar (*stock* 5 mM en DMSO) disueltos en KRB/25 mM glucosa para alcanzar las concentraciones finales. Como control de activación se usó fenformina 5 mM.

Obtención de extractos de células HEK293T

Tras los correspondientes tratamientos, se eliminó el sobrenadante y se congelaron rápidamente en N₂ líquido. Las placas fueron procesadas una por una, y mantenidas en hielo, añadiendo en primer lugar el tampón de lisis frío. La composición del tampón era la siguiente: Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 15 mM pH 8,0, NaF 50 mM, Na₄P₂O₇ 15 mM, sacarosa 0,6 M, 2-Mercaptoetanol 15 mM, una mezcla de inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche) y PMSF 1 mM. Las células se recogieron en tampón de lisis con la ayuda de un rascador y fueron lisadas pasándolas por jeringas de 24 Gx5/8" 4 veces cada muestra. Se reservó una pequeña cantidad para medir la cantidad de proteína mediante Bradford y al resto se le añadió tampón de carga para electroforesis y se hirvió durante 5 min, manteniéndose a -20°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford, con el *Bio-Rad Bradford Protein Assay Reagent* (BioRad).

Análisis de proteínas mediante western blot

Los extractos de proteínas se analizaron por SDS-PAGE en geles del 8 o del 10% de acrilamida y de 1,5 mm de grosor. Se cargaron 30 µg de proteína y se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore) durante 1,5 h a 100 V. El bloqueo se hizo con 5% de leche desnatada en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó incubando el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados a temperatura ambiente con TBS-T de 10 min cada uno, se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado a

HRP. Después de tres lavados de 10 min a temperatura ambiente con TBS-T, las membranas se revelaron con ECL *plus* (Pierce) y se procesaron con un equipo FUJI LAS 3000 (*Fujifilm*). Los anticuerpos utilizados fueron: Anti-pAMPK α Thr172, anti-AMPK β 1/ β 2, anti-ACC y anti-pACCser79 de la casa *Cell Signaling Technology* (Danvers, MA, USA) diluidos 1/1000. El anticuerpo secundario *goat anti-rabbit HRP* de la casa Santa Cruz Technology a una dilución 1/5000 ó 1/10000. La detección de bandas con los 31 anticuerpos Anti-pAMPK α Thr172 y anti-pACCser79 (sustrato de AMPK) respecto de sus controles de carga respectivos (anti-AMPK β 1/ β 2 y anti-ACC) se tomó como indicativo de activación de AMPK.

Las células Hek293 son tratadas con las concentraciones indicadas de los compuestos a estudiar durante 1 hora. Las células lisadas son analizadas mediante *Western Blot* usando anti-phosphoThr172 AMPK alfa, anti-AMPK β 1 (usado como control de carga), anti-phosphoSer79ACC y anti-ACC (usado como control de carga).

2.5.5 Ensayos de activación de células T de bazo de ratón

Cultivos celulares

Como fuente de linfocitos se utilizaron bazos ratones C57/Bl6 de 2 a 3 meses de edad mantenidos y criados en el estabulario del Centro Nacional de Microbiología (ISCI). Se extrajeron los bazos y se disgregaron en medio de cultivo de células (DMEM, con 10% de suero bovino fetal). Después de centrifugar las células, los eritrocitos fueron eliminados mediante lisis en solución BD Pharm (Beckton Dickinson). La población celular resultante fue sembrada (2×10^4 /pocillo) en placas multipocillos P-96 (en un volumen de 200 μ l) y estimulada con anti-CD3 y anti-CD28, que activa específicamente linfocitos T. En cada muestra se añadió a este estímulo el compuesto indicado en cada figura. Se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas al cabo de las cuales se retiró parte del sobrenadante de medio de cultivo para analizar posteriormente las citoquinas secretadas al medio. Las células sedimentadas se utilizaron para las medidas de proliferación.

Medidas de proliferación

La proliferación se cuantificó mediante el método colorimétrico que utiliza MTT⁴⁹. Después de 3 horas a 37°C se disolvieron los cristales formados con isopropanol ácido y se

determinaron las densidades ópticas en cada muestra como medida de proliferación. Cada muestra fue ensayada por cuadruplicado y en las figuras se representan las medias mostrando los errores estandar.

Cuantificación de citoquinas

Los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron utilizados para cuantificar las citoquinas secretadas por los linfocitos T durante el tiempo de cultivo mediante ELISA. Los anticuerpos de captura fueron 11B11, R46A.2, Jes5-2A5 y e Bio17CK15A5 para el reconocimiento de IL-4, IFN γ , IL-10 e IL-17, respectivamente. Como anticuerpos de detección se utilizaron formas biotiniladas de BVD6-24G2 para IL-4; XMG 1.2 para IFN γ ; Jes5-16E3 para IL-10 y Ebio 17B7 para IL-17. Cada muestra fue ensayada por cuadruplicado y en las figuras se representan las medias mostrando los errores estándar.

2.5.6 Ensayos de medida de la solubilidad termodinámica

Se prepara una disolución patrón del compuesto a estudiar a una concentración 10 mM en DMSO. Se preparan también tres disoluciones *buffer*, la primera de pH 7,4, 45 mM (50 mL agua desionizada, 0,272 mL etanolamina, 0,616 g KH₂PO₄ y 0,492 g KOAc. Ajustar a pH 7,4 con HCl 1N o KOH 1N, y añadir la cantidad necesaria de KCl 0,15 M hasta 100 mL), la segunda de pH 1,2, 45 mM (60 ml KCl 0,15 M y diluir con agua desionizada. Ajustar a pH con HCl 1N) y la tercera de pH 5,5 (3000 μ L de la disolución de acetato sódico 3M pH=5.2 y diluir con agua desionizada a 200mL. Ajustar pH con NaOH 0,1N en caso de que sea necesario).

Para realizar la recta de calibrado, se prepara en un *eppendorf* una disolución *stock* 0 μ M con 75 μ L de DMSO + 1425 μ L de *buffer*:acetonitrilo 80:20 y en otro *eppendorf* una disolución *stock* 500 μ M con 75 μ L del stock 10mM + 1425 μ L de *buffer*:acetonitrilo 80:20. Se preparan los puntos de la recta de calibrado de acuerdo con la tabla 2.3. La última columna, el patrón de concentración 10 mM, se prepara sólo para compuestos de baja solubilidad. En muchos casos puede que no sea posible medirlo debido a una absorbancia próxima al límite de detección.

Tabla 2.3. Disoluciones para la recta de calibrado.

| Patrón | P0 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | QC (P3) | P10 μ M |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-------------|
| Concentración, μ M | 0 | 50 | 100 | 250 | 350 | 500 | 250 | 10 |
| Concentración mg/L, suponiendo peso molecular=300 | 0 | 15 | 30 | 75 | 105 | 150 | 75 | 3 |
| mL de stock 0 μ M | 200 | 180 | 160 | 100 | 60 | 0 | 100 | 196 |
| mL de stock 500 μ M | 0 | 20 | 40 | 100 | 140 | 200 | 100 | 4 |
| V final (mL) | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |

Se agitan manualmente y se miden con el equipo UV. Para la aceptación de la recta de calibrado se debe cumplir $r^2 > 0.990$. El % residual en cada punto de calibrado debe ser $< 15\%$, y el error relativo de la medida de QC debe ser $< 15\%$. En caso de que no se cumpla alguno de estos supuestos, se debe repetir el calibrado.

Se disuelve la muestra en un *epENDORF* con 10 μ L o 50 μ L de DMSO. Añadir 990 μ L o 950 μ L de disolución *buffer*. Así la concentración de DMSO en muestra es del 1% o del 5% (v/v). Las muestras se realizan por triplicado.

Se agita a t.a. durante 2 h. y se centrifuga a 135 rpm durante 15 minutos. En algún caso, puede ser necesario tiempos de centrifugado superiores. Se transfieren 160 μ L del sobrenadante a un pocillo de una placa de 96 pocillos y se diluye añadiendo 40 μ L de acetonitrilo.

Se mide la absorbancia UV de la recta de calibrado y QC, y una vez aceptada la calibración, las muestras. Antes de aplicar unas condiciones de medida se debe realizar un análisis mediante HPLC para comprobar la pureza del compuesto y localizar los máximos de absorción. Se mide la absorbancia a una longitud de onda que coincida preferentemente con un máximo de absorción del compuesto y una longitud de onda superior a 270 nm. Ésta última es para asegurar que el DMSO no afecta a la medida ya que tiene niveles extremadamente bajos de absorbancia UV en toda la gama de longitud de onda de 270-400 nm.

La cuantificación de la solubilidad se realiza mediante la Ley de Lambert Beer. La absorbancia (A) es directamente proporcional a la longitud (b) de la trayectoria que atraviesa la disolución y a la concentración (c) de la especie absorbente, donde la constante de proporcionalidad es la absorptividad. Si la concentración viene dada en moles/litro se denomina absorptividad molar, ϵ :

$$A = \epsilon bc.$$

Bibliografía del capítulo 2

1. Cool, B.; Zinker, B.; Chiou, W.; Kifle, L.; Cao, N.; Perham, M.; Dickinson, R.; Adler, A.; Gagne, G.; Iyengar, R.; Zhao, G.; Marsh, K.; Kym, P.; Jung, P.; Camp, H. S.; Frevert, E., Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metabolism* **2006**, 3 (6), 403-416.
2. Davies, S. P.; Carling, D.; Hardie, D. G., Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. *European Journal of Biochemistry* **1989**, 186 (1-2), 123-128.
3. Iyengar, R. R.; Judd, A. S.; Zhao, G.; Kym, P. R.; Sham, H. L.; Gu, Y.; Liu, G.; Liu, M.; Zhao, H.; Clark, R. F.; Frevert, E. U.; Cool, B. L.; Zhang, T.; Keyes, R. F.; Hansen, T. M.; Xin, Z. Thienopyridones as AMPK activators for the treatment of diabetes and obesity. US2005/38068, **2005**, Abbott Laboratories.
4. Zhao, G.; Iyengar, R. R.; Judd, A. S.; Cool, B.; Chiou, W.; Kifle, L.; Frevert, E.; Sham, H.; Kym, P. R., Discovery and SAR development of thienopyridones: A class of small molecule AMPK activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (12), 3254-3257.
5. Anderson, S. N.; Cool, B. L.; Kifle, L.; Chiou, W.; Egan, D. A.; Barrett, L. W.; Richardson, P. L.; Frevert, E. U.; Warrior, U.; Kofron, J. L.; Burns, D. J., Microarrayed compound screening (μ ARCS) to identify activators and inhibitors of AMP-activated protein kinase. *Journal of Biomolecular Screening* **2004**, 9 (2), 112-121.
6. Hardie, D. G.; Schaffer, B. E.; Brunet, A., AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol.* **2016**, 26 (3), 190-201.
7. Calabrese, M. F.; Rajamohan, F.; Harris, M. S.; Caspers, N. L.; Magyar, R.; Withka, J. M.; Wang, H.; Borzilleri, K. A.; Sahasrabudhe, P. V.; Hoth, L. R.; Geoghegan, K. F.; Han, S.; Brown, J.; Subashi, T. A.; Reyes, A. R.; Frisbie, R. K.; Ward, J.; Miller, R. A.; Landro, J. A.; Londregan, A. T.; Carpino, P. A.; Cabral, S.; Smith, A. C.; Conn, E. L.; Cameron, K. O.; Qiu, X.; Kurumbail, R. G., Structural basis for AMPK activation: Natural and synthetic ligands regulate kinase activity from opposite poles by different molecular mechanisms. *Structure* **2014**, 22 (8), 1161-1172.

8. Xiao, B.; Sanders, M. J.; Carmena, D.; Bright, N. J.; Haire, L. F.; Underwood, E.; Patel, B. R.; Heath, R. B.; Walker, P. A.; Hallen, S.; Giordanetto, F.; Martin, S. R.; Carling, D.; Gamblin, S. J., Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nature Communications* **2013**, *4*.
9. Langendorf, C. G.; Kemp, B. E., Choreography of AMPK activation. *Cell Res.* **2015**, *25* (1), 5-6.
10. Hawley, S. A.; Fullerton, M. D.; Ross, F. A.; Schertzer, J. D.; Chevtzoff, C.; Walker, K. J.; Pegg, M. W.; Zibrova, D.; Green, K. A.; Mustard, K. J.; Kemp, B. E.; Sakamoto, K.; Steinberg, G. R.; Hardie, D. G., The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science* **2012**, *336* (6083), 918-922.
11. Sanders, M. J.; Ali, Z. S.; Hegarty, B. D.; Heath, R.; Snowden, M. A.; Carling, D., Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (45), 32539-32548.
12. Göransson, O.; McBride, A.; Hawley, S. A.; Ross, F. A.; Shpiro, N.; Foretz, M.; Violette, B.; Hardie, D. G.; Sakamoto, K., Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (45), 32549-32560.
13. Miglianico, M.; Nicolaes, G. A. F.; Neumann, D., Pharmacological Targeting of AMP-Activated Protein Kinase and Opportunities for Computer-Aided Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59* (7), 2879-2893.
14. Scott, J. W.; van Denderen, B. J. W.; Jorgensen, S. B.; Honeyman, J. E.; Steinberg, G. R.; Oakhill, J. S.; Iseli, T. J.; Koay, A.; Gooley, P. R.; Stapleton, D.; Kemp, B. E., Thienopyridone Drugs Are Selective Activators of AMP-Activated Protein Kinase β 1-Containing Complexes. *Chemistry and Biology* **2008**, *15* (11), 1220-1230.
15. Rana, S.; Blowers, E. C.; Natarajan, A., Small molecule adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase (AMPK) modulators and human diseases. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (1), 2-29.

16. Odegaard, J. I.; Chawla, A., The immune system as a sensor of the metabolic state. *Immunity* **2013**, *38* (4), 644-654.
17. Ganeshan, K.; Chawla, A., Metabolic regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology* **2014**, *32*, 609-634.
18. Osborn, O.; Olefsky, J. M., The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature Medicine* **2012**, *18* (3), 363-374.
19. Dandapani, M.; Hardie, D. G., AMPK: Opposing the metabolic changes in both tumour cells and inflammatory cells. *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41* (2), 687-693.
20. Salminen, A.; Hyttinen, J. M. T.; Kaarniranta, K., AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: Impact on healthspan and lifespan. *Journal of Molecular Medicine* **2011**, *89* (7), 667-676.
21. Salt, I. P.; Palmer, T. M., Exploiting the anti-inflammatory effects of AMP-activated protein kinase activation. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2012**, *21* (8), 1155-1167.
22. Larsen, C. M.; Faulenbach, M.; Vaag, A.; Ehses, J. A.; Donath, M. Y.; Mandrup-Poulsen, T., Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2009**, *32* (9), 1663-1668.
23. Das, B.; Venkateswarlu, K.; Majhi, A.; Siddaiah, V.; Reddy, K. R., A facile nuclear bromination of phenols and anilines using NBS in the presence of ammonium acetate as a catalyst. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2007**, *267* (1-2), 30-33.
24. Birnberg, N. C.; Liu, H.; Weng, Q. P.; Shang, H.; Yin, P.; Rajur, S. B.; Kim, H.; Salgaonkar, P. D.; Peet, N. P. AMPK MODULATORS. WO2009/100130, **2009**, Mercury Therapeutics, Inc.
25. Stadlbauer, W.; Badawey, E. S.; Hojas, G.; Roschger, P.; Kappe, T., Malonates in cyclocondensation reactions. *Molecules* **2001**, *6* (4), 338-352.
26. Rivkin, A.; Adams, B., Solvent-free microwave synthesis of 4-hydroxy-3-phenylquinolin-2(1H)-ones and variants using activated arylmalonates. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47* (14), 2395-2398.

27. Zhang, W., Annis, G. D. Malonic acid di-salts and a method for preparing malonyl dihalides. WO2013/90547, **2013**, E. I. Du Pont de Nemours and Company.
28. Goldthwait, D. A.; Greenberg, G. R.; Peabody, R. A., The structure of glycinamide ribotide. *The Journal of biological chemistry* **1956**, 221 (2), 1071-1081.
29. Nicolaou, K. C.; Bulger, P. G.; Sarlah, D., Palladium-catalyzed cross-coupling reactions in total synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition* **2005**, 44 (29), 4442-4489.
30. Scott, J. W.; Galic, S.; Graham, K. L.; Foitzik, R.; Ling, N. X. Y.; Dite, T. A.; Issa, S. M. A.; Langendorf, C. G.; Weng, Q. P.; Thomas, H. E.; Kay, T. W.; Birnberg, N. C.; Steinberg, G. R.; Kemp, B. E.; Oakhill, J. S., Inhibition of AMP-Activated Protein Kinase at the Allosteric Drug-Binding Site Promotes Islet Insulin Release. *Chemistry and Biology* **2015**, 22 (6), 705-711.
31. Kara, E. E.; Comerford, I.; Fenix, K. A.; Bastow, C. R.; Gregor, C. E.; McKenzie, D. R.; McColl, S. R., Tailored Immune Responses: Novel Effector Helper T Cell Subsets in Protective Immunity. *PLoS Path.* **2014**, 10 (2).
32. Zygmunt, B.; Veldhoen, M., T Helper Cell Differentiation. More than Just Cytokines. In *Advances in Immunology*, 2011; Vol. 109, pp 159-196.
33. Pierson, E.; Simmons, S. B.; Castelli, L.; Goverman, J. M., Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity. *Immunol. Rev.* **2012**, 248 (1), 205-215.
34. Toh, M. L.; Miossec, P., The role of T cells in rheumatoid arthritis: New subsets and new targets. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2007**, 19 (3), 284-288.
35. Annunziato, F.; Cosmi, L.; Liotta, F.; Maggi, E.; Romagnani, S., Type 17 T helper cells - Origins, features and possible roles in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology* **2009**, 5 (6), 325-331.
36. Lerner, A., New therapeutic strategies for celiac disease. *Autoimmun. Rev.* **2010**, 9 (3), 144-147.

37. Pattenden, L. K.; Middelberg, A. P. J.; Niebert, M.; Lipin, D. I., Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends Biotechnol.* **2005**, 23 (10), 523-529.
38. Haskins, K.; Cooke, A., CD4 T cells and their antigens in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Curr. Opin. Immunol.* **2011**, 23 (6), 739-745.
39. Farkas, Á.; Kemény, L., Monocyte-derived interferon-alpha primed dendritic cells in the pathogenesis of psoriasis: New pieces in the puzzle. *Int. Immunopharmacol.* **2012**, 13 (2), 215-218.
40. Zhou, X.; Spittau, B.; Krieglstein, K., TGF β signalling plays an important role in IL4-induced alternative activation of microglia. *Journal of Neuroinflammation* **2012**, 9.
41. Hofmann, S. R.; Rösen-Wolff, A.; Tsokos, G. C.; Hedrich, C. M., Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. *Clin. Immunol.* **2012**, 143 (2), 116-127.
42. Yao, Y.; Simard, A. R.; Shi, F. D.; Hao, J., IL-10-Producing lymphocytes in inflammatory disease. *International Reviews of Immunology* **2013**, 32 (3), 324-336.
43. Hetero-biaryl-pyridoquinazolinone derivatives as anti-cancer agents. EP944628, **2002**, American Cyanamid Company.
44. Chen, X.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Zhang, J.; Chen, J.; Li, M.; Cao, W.; Chen, J., Synthesis and characterization of oxadisilole-fused 9-aminoacridines and 12-aminobenzo[b]acridines. *European Journal of Organic Chemistry* **2014**, 2014 (19), 4170 - 4178.
45. Zhang, L.; Yang, Y.; Zhou, H.; Zheng, Q.; Li, Y.; Zheng, S.; Zhao, S.; Chen, D.; Fan, C., Structure-activity study of quinazoline derivatives leading to the discovery of potent EGFR-T790M inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 102, 445 - 463.
46. Novel cyclic benzimidazole derivatives useful anti-diabetic agents. WO2010/51206, **2010**, Merck Sharp andamp; Dohme Corp.; Metabasis Therapeutics, I. N. C.

47. Indole and indazole compounds that activate AMPK. US2013/267493, **2013**, Pfizer, I. N. C.
48. Thienopyridone derivatives useful as activators of AMPK. EP2679591, **2014**,
49. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65 (1-2), 55-63.

CAPITULO 3

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE DERIVADOS FLUORADOS DE 2-OXOINDOL COMO AGENTES ANTITUMORALES

| | |
|---|-----|
| 3.1 Introducción y objetivos | 112 |
| 3.2 Resultados | 114 |
| 3.2.1 Síntesis | 114 |
| 3.2.2 Evaluación biológica | 116 |
| A. Ensayos de actividad enzimática frente a AMPK | 116 |
| B. Estudio de activación en células de AMPK | 117 |
| C. Ensayos de viabilidad celular en cáncer de próstata | 119 |
| 3.2.3 Evaluación in silico del perfil tipo fármaco | 120 |
| 3.3 Discusión | 121 |
| 3.4 Conclusiones | 123 |
| 3.5 Procedimientos experimentales | 124 |
| 3.5.1 Métodos generales | 124 |
| 3.5.2 Procedimientos de síntesis | 124 |
| 3.5.3 Ensayos in vitro de activación de AMPK | 132 |
| 3.5.4 Ensayos de viabilidad celular | 132 |
| 3.5.5 Ensayos de activación en células de AMPK | 133 |
| Bibliografía del capítulo 3 | 134 |

3. Síntesis y evaluación de derivados fluorados de 2-oxoindol como agentes antitumorales

3.1. Introducción y objetivos

Aunque clásicamente el cáncer se ha entendido como una enfermedad genética y se relacionaba exclusivamente con mutaciones en oncogenes o en genes supresores de tumores, hoy día sabemos que esta visión es muy reduccionista y que hay que tener en cuenta otros factores para entender cómo se origina y cómo progresa. En este sentido, en los últimos años el campo de investigación del cáncer ha avanzado mucho, y recientemente las alteraciones metabólicas de las células tumorales se ha añadido como otra característica esencial de la mayoría de las células cancerígenas¹⁻².

La glucolisis y la fosforilación oxidativa son las principales vías metabólicas de provisión de energía de las células, estando regulada su actividad de forma coordinada por la disponibilidad de nutrientes³⁻⁴. Estudios dirigidos a establecer los vínculos entre el crecimiento tumoral y el aumento de la glucolisis en las células de cáncer han puesto de manifiesto la importancia de la activación o inhibición de determinados oncogenes y genes supresores de tumores, así como de determinadas vías de señalización. Éstas afectan a la glucolisis, a la fosforilación oxidativa o a las dos vías de forma simultánea⁵. Como se adelantó en el capítulo 1, mientras que en las células no proliferativas de forma general hay poca demanda de glucosa porque no requieren tantos intermediarios metabólicos, las células proliferativas requieren captación mucho más rápida de glucosa porque necesitan más precursores de macromoléculas, y prefieren la glicolisis aerobia antes que la fosforilación oxidativa, energéticamente más eficiente pero más lenta. Es en este punto donde AMPK, como regulador del metabolismo energético ocupa un papel prometedor en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento del cáncer⁶⁻⁸.

Desde el punto de vista de los moduladores de AMPK, el núcleo de 2-oxoindol es un motivo químico de gran interés, puesto que se encuentra en muchos de los ejemplos más representativos tanto de activadores como de inhibidores de esta quinasa. Como se comentó en el capítulo de introducción, el descubrimiento de esta familia de compuestos parte de los resultados originales de 2008 de Pang *et al.*⁹, que reportaban el prototipo PT1. Basándose en

estos resultados, las patentes publicadas en 2011 por F. Hoffmann – La Roche AG y el trabajo de 2013 del grupo de Li *et al.*¹⁰⁻¹³ implantaron definitivamente estas estructuras como potentes activadores de AMPK para el tratamiento de diversas enfermedades. Los compuestos más representativos de esta familia, tanto los descritos por Li y col. como los de Hoffmann – La Roche AG, cuentan con características estructurales comunes (**figura 3.1**): se trata concretamente de 2-oxoindoles con un doble enlace en posición 3 del anillo bicíclico. Este doble enlace está sustituido por un grupo aromático que queda en relación *cis* respecto al anillo aromático del indol (compuestos **3.1** y **3.2**). Por otra parte, *Sunitinib* (compuesto **3.3**) es uno de los 2-oxoindoles inhibidores de AMPK mejor contrastados, y se emplea actualmente como fármaco en pacientes de cáncer¹⁴.

En este capítulo se llevará a cabo la síntesis de una nueva familia de 2-oxoindoles que toma como partida prototipos descritos en los trabajos comentados y que presentan aportaciones estructurales novedosas, con el objeto de obtener información acerca de la activación de AMPK por parte de estos compuestos. Estas aportaciones se pueden observar en la estructura general **3.4** de la **figura 3.1**. Se mantiene el sustituyente bencílico en posición C-3 del 2-oxoindol, pero en esta ocasión la unión se realiza a través de un enlace sencillo, eliminando la planaridad para contrastar su importancia en la interacción. El otro enlace en posición 3 lo ocupa un átomo de flúor, bioisómero del hidrógeno. El nitrógeno en posición 1 del anillo de indol aparecerá tanto como amino libre, como sustituido con estructuras bencílicas similares a las presentes en los prototipos **3.1** y **3.2**. Por último, teniendo en cuenta la sustitución que presenta *Sunitinib* en la posición 5 del indol, se explorará también la importancia de esta posición, preparando representantes que introduzcan en esta posición un heteroátomo.

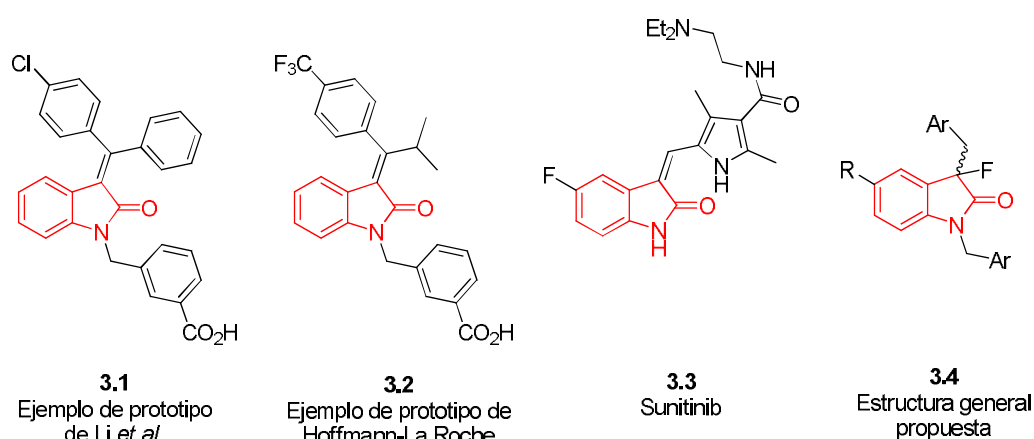


Figura 3.1. Estructura de algunos de los principales 2-oxoindoles y estructura general de los derivados objetivo. El núcleo de 2-oxoindol aparece destacado. En el caso de *Sunitinib*, se muestra su EC₅₀ correspondiente a una de sus dianas terapéuticas.

Los compuestos preparados se evaluarán como moduladores de AMPK, obteniendo así información acerca de la relación estructura-actividad de esta familia de compuestos que podrá ser útil a la hora de postular nuevos candidatos a fármacos a través de la incidencia en nuestra proteína diana. Puesto que *Sunitinib* es un fármaco tan sólidamente validado que actualmente se emplea para el tratamiento de pacientes de varios tipos de cáncer, se prestará especial atención a la evaluación biológica de estos nuevos compuestos como agentes antitumorales.

3.2. Resultados.

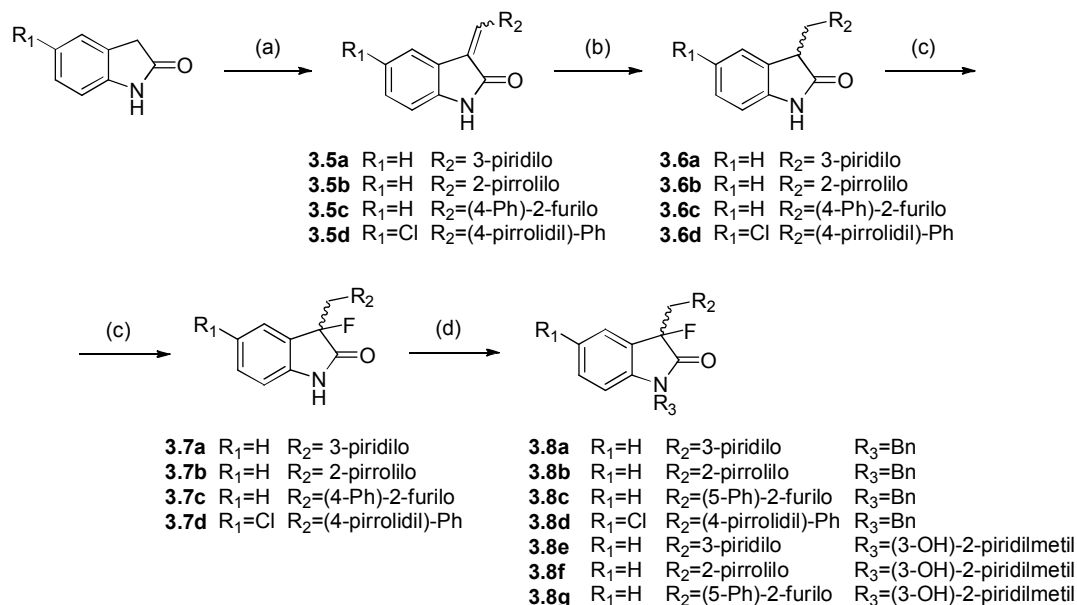
3.2.1. Síntesis

El **esquema 3.1** muestra la ruta sintética empleada para la síntesis de esta familia de compuestos. Así, el primer paso lo constituye la condensación sobre el carbono en posición 3 del 2-oxoindol y del 5-cloro-2-oxoindol con aldehídos de naturaleza aromática. La reacción se lleva a cabo con calefacción a reflujo y sin necesidad de catalizador¹⁵, generándose las mezclas de isómeros geométricos *E-Z* **3.5 a-d**, correspondientes a la formación de un doble enlace.

El doble enlace formado es posteriormente reducido con borohidruro de sodio en metanol con rendimientos moderados, entre el 37 y el 64 %. De esta forma se crea un centro estereogénico en la posición 3 del 2-oxoindol. Aunque este paso está descrito en la bibliografía sin purificación del intermedio condensado¹⁵, en nuestro caso se obtuvieron mejores rendimientos aislando los intermedios insaturados. Los compuestos reducidos **3.6 a-d**, se obtuvieron con rendimientos entre 27 – 50 %.

Como paso clave de la secuencia sintética, los compuestos **3.6 a-d** se trataron con *Selectfluor* para llevar a cabo la reacción de fluoración en posición 3. *Selectfluor* actúa como fuente de flúor electrófilo¹⁶⁻¹⁷, de forma que se podría adicionar al doble enlace de la forma enólica del carbonilo en posición 2. Los tiempos de agitación son de 6 – 7 horas y los rendimientos moderados, entre un 18 y un 53 %. Estos rendimientos moderados pueden tener una doble causa. En primer lugar, los análisis de HPLC-MS de estas reacciones mostraron varios picos cromatográficos con valores de *m/z* compatibles con nuestros productos. Estos otros picos puede corresponder a derivados fluorados donde el átomo de flúor se haya adicionado a los heterociclos π -excedentes como el pirrol y el furano. En segundo lugar, *Selectfluor* genera tras

reaccionar fluoruro de hidrógeno que provoca medios fuertemente ácidos que dan lugar a la descomposición parcial de nuestros sustratos.



Esquema 3.1. Síntesis de la familia de 3-fluor-2-oxindoles. Reactivos y condiciones: (a) $R_2\text{-CHO}$ (1 eq.), MeOH, ref., 3 h, 37 – 64 %; (b) NaBH_4 (5 eq.), MeOH, t.a., 8 h, 27 – 50 %; (c) *Selectfluor* (2 eq.), MeOH, 0 °C, 6 – 7 h, 18 – 53 %. (d) Para $R_3 = \text{Bn}$: BnBr (1 eq.), NaH (1.1 eq.), DMF anh., 0 °C \rightarrow t.a., 25 min, 21 – 47 %. Para $R_3 = (3\text{-OH})\text{-2-piridilmetil}$: $R_3\text{-Br} \cdot \text{HCl}$ (1 eq.), NaH (1.1 eq.), t.a., 2 – 3 h, 9 – 30 %.

Por último, la N-alkilación transcurre en DMF anhidra con hidruro de sodio a 0 °C¹⁸, con rendimientos discretos, entre el 21 y el 47 % para las bencilaciones y entre el 9 y el 30 % para la introducción del resto 3-hidroxi-2-piridilo. En el caso del compuesto **3.7 d** se observó la descomposición del producto en las condiciones de alquilación en presencia del bromohidrato de 3-hidroxi-2-piridilo.

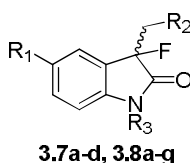
Los rendimientos fueron moderados en las etapas de formación de los compuestos **3.6 a-d**, **3.7 a-d** y **3.8 a-g**. Una de las causas es la reversión parcial a los intermedios insaturados **3.5 a-d**, como se confirma tanto por TLC como por HPLC-MS. Como estos intermedios extienden la aromaticidad a toda la estructura, se podría esperar que su formación esté termodinámicamente favorecida, tanto en medios básicos como ácidos.

3.2.2. Evaluación biológica

A. Ensayos de actividad enzimática frente a AMPK.

La evaluación biológica inicial de la familia de los oxoindoles se llevó a cabo a través de un ensayo enzimático fluorométrico con la isoforma de AMPK recombinante $\alpha 1\beta 1\gamma 2$. Este ensayo evalúa la capacidad de fosforilación de AMPK al péptido sustrato AMARAASAAALARRR. Los compuestos fueron evaluados a concentraciones 30 μ M, utilizando como control del ensayo el activador endógeno, AMP, y el activador descrito por Abbott, A-769662. Los resultados se muestran en la **tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Resultados del ensayo enzimático de activación de AMPK ($\alpha 1\beta 1\gamma 2$) para la familia de los oxoindoles.



3.7a-d, 3.8a-g

| Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ | % control, 30 μ M | % control, 200 μ M |
|--------------|----------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| AMP | - | - | - | - | 454 |
| A-769662 | - | - | - | 647-776 | |
| 3.7 a | H | 3-piridilo | H | 43 | |
| 3.7 b | H | 2-pirrolilo | H | -51 | |
| 3.7 c | H | (5-Ph)-2-furilo | H | -2 | |
| 3.7 d | Cl | (4-pirrolidil)-Ph | H | -18 | |
| 3.8 a | H | 3-piridilo | Bn | 72 | |
| 3.8 b | H | 2-pirrolilo | Bn | -19 | |
| 3.8 c | H | (5-Ph)-2-furilo | Bn | 31 | |
| 3.8 d | Cl | (4-pirrolidil)-Ph | Bn | 36 | |
| 3.8 e | H | 3-piridilo | (3-OH)-2-piridilmetil | 18 | |
| 3.8 f | H | 2-pirrolilo | (3-OH)-2-piridilmetil | 36 | |
| 3.8 g | H | (5-Ph)-2-furilo | (3-OH)-2-piridilmetil | 4 | |

A la vista de los resultados obtenidos, se puede plantear las primeras relaciones estructura actividad para esta familia, observándose como de los productos ensayados, los compuestos **3.7 b – d** y **3.8 b** muestran datos de inhibición enzimática a la concentración 30 μ M. Desde un punto de vista estructural, se observa que todos ellos son derivados no sustituidos en el nitrógeno del anillo de oxoindol (**3.7 b – d**). A excepción del derivado N-bencil sustituido, **3.8b**, análogo del derivado no sustituido más potente de esta serie, **3.7b**.

Por otro lado, tan sólo el derivado **3.7 a**, portador del grupo piridilo, es el único ejemplo ensayado de derivado de oxoindol no sustituido en el nitrógeno que no ha mostrado capacidad inhibitoria., que a diferencia de los otros derivados no sustituidos, es portador de un sistema heterocíclico de seis miembros en la posición C-3.

B. Estudios de activación en células de AMPK

Con el fin de investigar el efecto de los compuestos en la actividad de AMPK a nivel celular, se seleccionaron los compuestos **3.7 b – d** y **3.8 b** para llevar a cabo ensayos de fosforilación de AMPK en la línea tumoral de cáncer de próstata humana, PC-3. De manera que las células PC-3 se trataron con una concentración 25 μ M de los compuestos durante una hora. Las células lisadas son analizadas mediante *Western blot* usando anti-fosfo-Thr172 AMPK, y anti-fosfo-Ser79 ACC.

Los resultados de *Western blot*, recogidos en la **figura 3.2**, muestran como el compuesto **3.7 d** induce fosforilación de AMPK a la concentración de ensayo, mientras que el nivel total de la proteína empleada como control de carga, β -tubulina, no cambia. Sin embargo, para el resto de los compuestos ensayados, se observa una disminución de la fosforilación a la concentración ensayada.

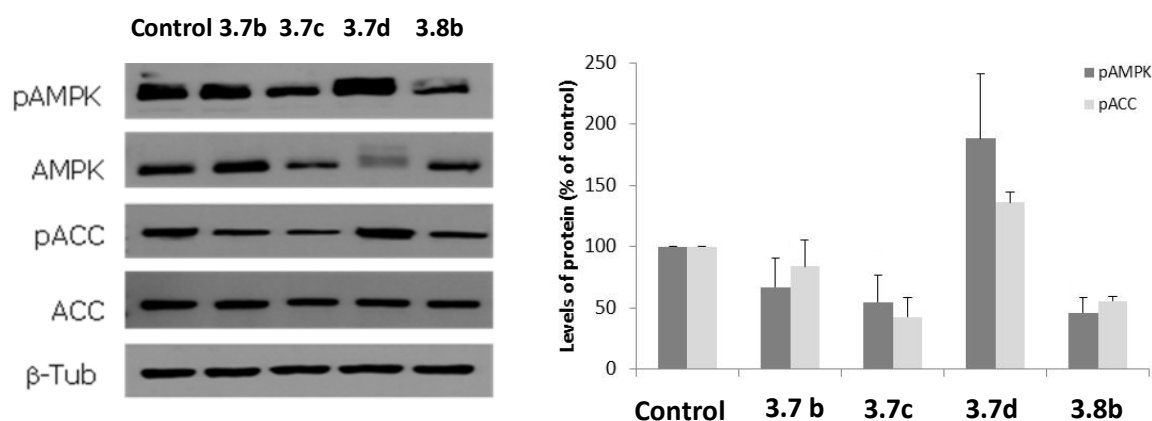


Figura 3.2. Niveles de fosfo-AMPK(Thr172), AMPK total, fosfo- ACC(Ser79) y ACC total después de su tratamiento con los compuestos objeto de estudio durante 1 h a 25 μ M en células humanas de cáncer de próstata PC-3. Los niveles de β -tubulina se muestran como control de carga. La imagen es representativa de tres experimentos. A la derecha se muestran los valores de los densitometrados de las bandas.

Dado que la forma activada de AMPK es responsable de los cambios metabólicos a través de la fosforilación de sustrato ACC, se evaluó la fosforilación de ACC en presencia de los compuestos. Los datos ponen de manifiesto que de nuevo el compuesto **3.7 d** es el que mostraba un aumento en la fosforilación de ACC a la concentración del ensayo, mientras que en resto de los compuestos se produce un descenso de la fosforilación (**figura 3.2**).

Con el fin de corroborar el perfil de los moduladores ensayados, se llevaron a cabo estudios en presencia del activador de AMPK, AICAR. De manera que se añadió AICAR a una concentración 1mM durante los últimos 30 minutos de tratamiento de las células humanas de cáncer de próstata PC-3 con los compuestos.

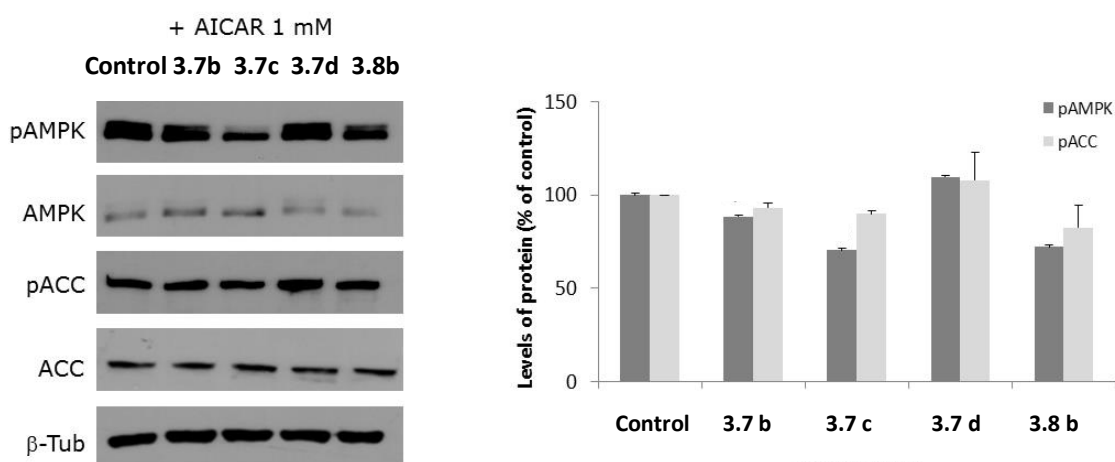


Figura 3.3. Niveles de fosfo-AMPK(Thr172), AMPK total, fosfo- ACC(Ser79) y ACC total después de su tratamiento con los compuestos objeto de estudio durante 1 h a 25 μ M, seguidos de 1mM de AICAR durante los últimos 30 minutos en células humanas de cáncer de próstata PC-3. Los niveles de β -tubulina se muestran como control de carga. La imagen es representativa de tres experimentos. A la derecha se muestran los valores de los densitometrados de las bandas.

Tal y como se observa en la **figura 3.3**, la presencia de AICAR compensa los niveles de AMPK fosforilada, comparado con los niveles observados previamente para los derivados de 2-oxindoles (**figura 3.2**). De manera que para los compuestos **3.7b**, **3.7c** y **3.8b**, se observa niveles de AMPK fosforilada y ACC fosforilada superiores a los ensayados realizados en ausencia de activador, mientras que en el caso del compuesto **3.7d**, se observan niveles de AMPK y ACC fosforiladas inferiores a los observados previamente aunque ligeramente superiores al control.

C. Ensayos de viabilidad celular en cáncer de próstata

Con el fin de estudiar el efecto de los compuestos en la capacidad proliferativa de las células y dado que el de próstata es uno de los cánceres cuya relación con AMPK está mejor contrastada¹⁹, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular con los compuestos que *in vitro* mostraron actividad inhibitoria, empleándose dos líneas celulares diferentes, una epitelial (PNT2) y otra tumoral (PC-3) de próstata humana. Los compuestos **3.7 b**, **3.7 c**, **3.7 d** y **3.8 b** se incubaron a dosis crecientes durante 24 y 48 horas y la viabilidad celular se analizó empleando el método colorimétrico de MTT (**figuras 3.4 y 3.5**).

Los datos obtenidos ponen de manifiesto el efecto antiproliferativo que presentan los compuestos **3.7 c** y **d**, los cuales muestran una reducción de la viabilidad celular dependiente de la dosis en la línea celular de células epiteliales de próstata humana normal, PNT2 (**figura 3.4**). Se alcanzan valores cercanos al máximo de inhibición con concentraciones en torno a 10 μ M para **3.7 c** y en torno a 25-30 μ M para **3.7 d**.

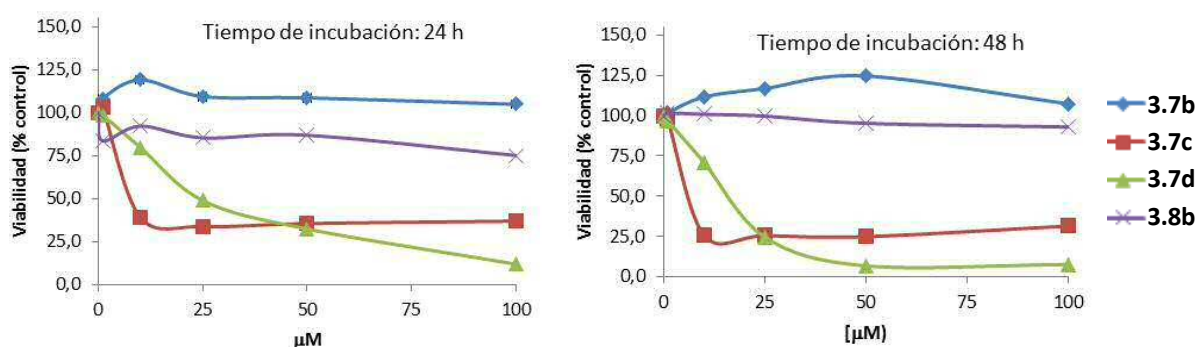


Figura 3.4. Variación de la viabilidad celular de células epiteliales de próstata humana normal, PNT2, tratadas con distintas concentraciones de los compuestos durante 24 y 48 horas. Las células PNT2 se incubaron con los diferentes compuestos a las dosis y tiempos indicados tras lo cual se determinó la viabilidad celular mediante MTT. Los resultados están referidos al de las células tratadas con vehículo, tomado como 100% de viabilidad y son medias \pm D.E. de tres experimentos realizados por duplicado.

Sin embargo, en el ensayo realizado en sobre la línea celular de cáncer de próstata, PC-3 (**figura 3.5**) es el derivado **3.7 d** el único de los compuestos ensayados que muestra un claro efecto antiproliferativo.

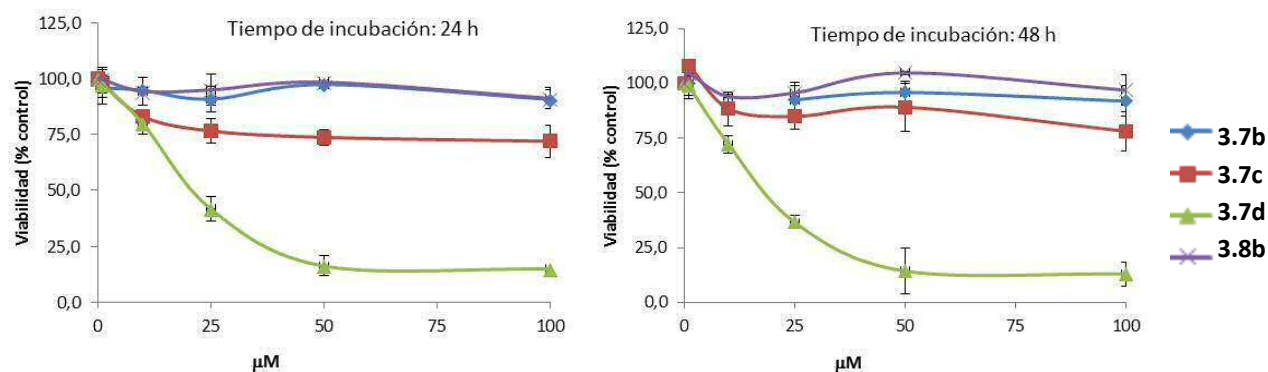


Figura 3.5. Variación de la viabilidad celular de células humanas de cáncer de próstata PC-3 tratadas con distintas concentraciones de los compuestos a 24 y 48 horas. Las células PC-3 se incubaron con los diferentes compuestos a las dosis y tiempos indicados tras lo cual se determinó la viabilidad celular mediante MTT. Los resultados están referidos al de las células tratadas con vehículo, tomado como 100% de viabilidad y son medias \pm D.E. de tres experimentos realizados por duplicado.

Entre los cuatro compuestos que se sometieron a este ensayo, destaca la actividad de **3.7 d**, el más efectivo en células de cáncer de próstata, seleccionándose para estudios posteriores.

3.2.3. Evaluación *in silico* del perfil tipo fármaco

La determinación de las propiedades tipo fármaco en las etapas tempranas del proceso de desarrollo de nuevos fármacos, es una de las herramientas habituales dentro de los programas de química médica, ya que permite la toma de decisiones en base a criterios fundamentales para el futuro desarrollo de candidatos a fármacos, tales como permeabilidad, absorción oral o paso de barrera hematoencefálica. Dentro de este contexto, los métodos computacionales, como métodos predictivos de propiedades tipo fármaco, ocupan un lugar importante debido al balance favorable tiempo-coste que supone frente a los resultados que se pueden obtener a partir de ensayos *in vitro* o *in vivo*.

En este contexto, decidimos realizar la evaluación *in silico* del perfil tipo fármaco del compuesto **3.7d** con el fin de determinar parámetros que ayudaran a delinear su potencial como fármaco. Para ello se llevó a cabo la evaluación de las propiedades farmacocinéticas del compuesto empleando el programa *QikProp* 3.5, integrado dentro del programa Maestro (Schrödinger LLC, New York, USA). Tal y como queda recogido en la **tabla 3.2**, los datos calculados muestran que el compuesto **3.7 d** presenta un perfil tipo fármaco adecuado, al

menos en los datos referidos a la predicción de la solubilidad acuosa, la permeabilidad celular y la absorción en el tracto gastro-intestinal.

Tabla 3.2. Descriptores físico-químicos para el compuesto **3.7 d** calculados con *QikProp* 3.5.

| Descriptor | Valor 3.7 d |
|-----------------------------------|-------------|
| <i>QPlogS</i> ^a | -4,961 |
| <i>QPPCaco</i> ^b | 3041,015 |
| <i>QPPMDCK</i> ^c | 2307,16 |
| Absorción humana (%) ^d | 100 |

^aPredicción de la solubilidad acuosa (rango del 95% de los fármacos: -6.5 a +0.5). ^bPermeabilidad celular aparente Caco-2 (nm/s) [<25, pobre; >500, excelente]. ^cPermeabilidad celular aparente MDCK (nm/s) [<25, pobre; >500, excelente]. ^dAbsorción humana normal en el tracto gastro-intestinal [< 25% es pobre].

3.3. Discusión.

En este capítulo se ha preparado una pequeña colección de derivados fluorados de 2-oxindol con el fin de contribuir al esclarecimiento de los requisitos estructurales clave en la modulación de AMPK de esta familia de compuestos. A la vista de las estructuras reportadas, la disposición de los sustituyentes alrededor de la posición C-3 del sistema de 2-oxindol puede estar jugando un papel importante en la interacción con el enzima y una traducción directa en el comportamiento biológico. Los derivados preparados en este capítulo están diseñados sobre esta premisa, confiriendo una mayor libertad conformacional que los reportados hasta el momento.

A partir de los ensayos enzimáticos realizados, se puede concluir que los compuestos **3.7 b**, **3.7 c**, **3.7 d** y **3.8 b** han presentado un perfil de inhibidores. Estos compuestos comparten, estructuralmente, ciertas similitudes con *Sunitinib*. En concreto, tres de ellos están entre los cuatro no sustituidos en el nitrógeno (**3.7 b – d**) y otros tres tienen un heterociclo de cinco miembros. Además, **3.7 c** y **3.7 d** tienen sustituyentes especialmente voluminosos, más parecidos al de *Sunitinib*. Esto induce a pensar que estas características (nitrógeno del oxindol libre y heterociclo de cinco miembros) podrían ser importantes a la hora de determinar el comportamiento activador o inhibidor de los compuestos. Además, el derivado **3.7 d** es el único que presenta sustitución por un átomo de cloro, en posición 5 del oxindol.

En este sentido, *Sunitinib* ha sido co-cristalizado con la proteína KIT¹⁴, que presenta un dominio quinasa similar al de la estructura cristalina de la subunidad $\alpha 2$ de AMPK. Efectivamente, se comprueba que el átomo de flúor, el anillo de pirrol de cinco miembros y el amino libre son importantes en el establecimiento de interacciones con aminoácidos de esta subunidad. A este respecto es importante también el metilo del pirrol de *Sunitinib*.

Este fármaco también presenta una diferencia estructural con respecto a activadores bien contrastados como **3.1** o **3.2**, en los que el doble enlace sitúa el sustituyente aromático en relación *cis* respecto al benceno del indol, mientras que en *Sunitinib* se sitúa en *trans*, siendo esta disposición *trans* la que posibilita que se establezcan las interacciones que estabilizan el aducto *Sunitinib*:KIT.

Nuestros compuestos, al eliminar la planaridad, podrían adoptar conformaciones parecidas a la disposición *cis* que no serían posibles si no fuese libre el giro del enlace en posición C-3. A falta de experimentos que permitan confirmarlo, los resultados obtenidos del aducto *Sunitinib*:KIT parecen corresponderse bien con nuestros datos de inhibición *in vitro*. La subunidad α con la que llevó a cabo el ensayo *in vitro* sobre AMPK es $\alpha 1$, mientras que la subunidad catalítica de KIT es parecida a $\alpha 2$. Este cambio de isoforma no parece afectar a la aparentemente buena correspondencia entre resultados.

Los ensayos en cultivos celulares arrojan información interesante. En primer lugar, algunos miembros de la familia actúan como inhibidores (**3.7 b, c** y **3.8 b**), mientras que **3.7 d** es activador. Por otro lado, en presencia de AICAR se observa compensación de los efectos.

En el caso de los inhibidores, este resultado podría ser esperable. Pero en el caso singular de **3.7 d**, siendo activador como AICAR, no se observa contribución significativa respecto a los niveles control. Entre las justificaciones que se pueden aventurar, **3.7 d** podría estar, o bien compitiendo por el mismo sitio de unión a AMPK (en el caso de AICAR son los dominios de Bateman de la subunidad γ), o bien uniéndose a otro de los sitios descritos para esta proteína. Por ejemplo, el dominio quinasa al que se sabe que se une *Sunitinib*. Esta acción simultánea puede contrarrestarse de forma que la actividad de la enzima no varíe significativamente.

Adicionalmente, los ensayos antiproliferativos llevados a cabo establecen que tan sólo el compuesto **3.7d** se comporta como un potencial agente anti-tumoral.

3.4. Conclusiones.

El descubrimiento de que el supresor tumoral LKB1 media la activación de AMPK relaciona directamente la regulación del metabolismo energético y el cáncer. Sin embargo, diez años después de este hallazgo, los datos acumulados indican que el papel funcional de AMPK en la iniciación y progresión del cáncer es mucho más complejo de lo que se esperaba. Por un lado, AMPK participa en la ruta de señalización de supresor tumoral LKB1, demostrando su papel anti-tumorigénico. Por otro lado, AMPK es necesario para la supervivencia de las células cancerosas en condiciones de estrés metabólico, tales como hipoxia o privación de glucosa, de manera que actúa como pro-tumorigénico²⁰⁻²³. De manera que, dependiendo del contexto, AMPK juega un papel dual en la carcinogénesis.

En este capítulo se ha abordado la síntesis de una nueva familia de compuestos destacando entre los compuestos sintetizados el derivado **3.7 d**, que ha mostrado un comportamiento muy interesante en líneas celulares de cáncer de próstata. Atendiendo a su efecto antiproliferativo, **3.7d** se ha seleccionado para la realización de pruebas de eficacia *in vivo*, actualmente en curso.

Las conclusiones derivadas de este estudio supondrán un interesante punto de partida para trabajos en los que la optimización de esta selectividad puede desembocar en la candidatura de nuevos compuestos como fármacos para el tratamiento de estos u otros tipos de cáncer a través del innovador mecanismo de la modulación de AMPK.

Además, los compuestos sintetizados pueden contribuir a arrojar algo de luz sobre los mecanismos de acción que relacionan la actividad de AMPK con la supervivencia de células cancerosas, asunto que aún hoy está bajo debate y cuya resolución supondría un avance significativo en la lucha esta enfermedad.

3.5 Procedimientos experimentales.

3.5.1 Métodos generales

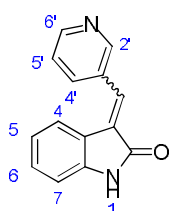
Todos los métodos de síntesis y de análisis por TLC, HPLC-MS y HPLC analíticos, punto de fusión y análisis elementales y las purificaciones por cromatografía en columna *Flash* se realizaron siguiendo los procedimientos indicados en el capítulo 2.

3.5.2 Procedimientos de síntesis

Procedimiento general de síntesis de 3-metilen-2-oxoindoles

Se añade el correspondiente aldehído (500 mg, 1 eq.) a una disolución de 2-oxoindol (1 eq.) en MeOH (25 mg/mL) a reflujo. La disolución se agita a reflujo durante 3h. Una vez terminada la reacción, se deja enfriar el crudo primero hasta t.a. y después a 0 °C. El precipitado resultante se filtra y se lava con más MeOH a 0 °C.

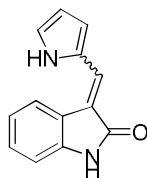
(*E, Z*)-3-(piridin-3-il-metilen)-2-oxo-indol²⁴ (3.5 a)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-metilen-2-oxoindoles, se obtienen 490 mg (47 %) de un sólido amarillo. **P.f.** 190 – 192 °C (bibl. 187 – 196 °C). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 13.32 (s, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, H-Ar), 7.57 – 7.46 (m, 2H, H-Ar), 7.30 (s, 1H, H-Ar), 7.27 – 7.18 (m, 2H, H-Ar), 7.11 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-Ar), 6.94 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-Ar), 6.83 (s, 1H), 6.43 (s, 1H).

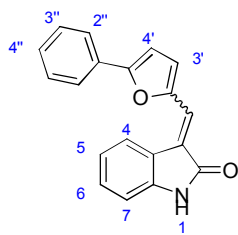
HPLC: *t_R* = 2.30 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 219.4 [M-3H]⁺.

(*E, Z*)-3-((1*H*-pirrol-2-il)metilen)indolin-2-ona²⁵ (3.5 b)

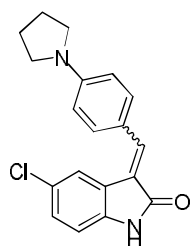


Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-metilen-2-oxoindoles, se obtienen 502 mg (64 %) de un sólido amarillo. **P.f.** 215 – 217 °C (bibl. 215 – 220 °C). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 13.18 (s, 1H, NH), 8.07 (s, 1H), 7.45 – 7.31 (m, 2H), 7.14 – 7.07 (m, 2H), 6.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H),

6.70 (s, 1H), 6.32 (s, 1H). **HPLC:** *t_R* = 4.74 (99 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 210.9 [M+H]⁺.

(E, Z)-3-(5-fenilfuran-2-il-metiliden)-2-oxo-indol²⁶ (3.5 c)

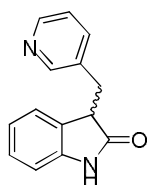
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-metilen-2-oxoindoles, se obtienen 445 mg (46 %) de un sólido naranja. **P.f.** 230 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10.59 (s, 1H), 8.49 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.57 (t, *J* = 7.7 Hz, 3H), 7.50 – 7.23 (m, 6H), 7.12 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H). **HPLC**: *t_R* = 5.32 (99 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 288.0 [M+H]⁺.

(E, Z)-5-cloro-3-(4-(pirrolidin-1-il)benziliden)indolin-2-ona (3.5 d)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-metilen-2-oxoindoles, se obtienen 366 mg (37 %) de un aceite amarillo. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.14 (s, 1H, NH), 9.64 (s, 2H), 7.72 – 7.52 (m, 4H), 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.63 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 3.41 – 3.33 (m, 4H, N-CH₂), 1.98 (t, *J* = 6.7 Hz, 4H, N-CH₂-CH₂). **HPLC**: *t_R* = 3.38 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 323.0 [M-2H]⁺.

Procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-2-oxoindoles

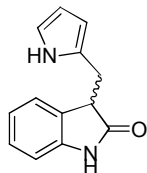
A una disolución del correspondiente 5-amino-3-fenil-1*H*-pirazol (1 eq.) en MeOH (10 mg/mL) se añade lentamente NaBH₄ (5 eq.) durante unos 30 min. manteniendo el burbujeo bajo control, y después se agita la mezcla a t.a. durante una noche. Una vez terminada la reacción, se añade un volumen de agua igual a la mitad del crudo y la mezcla se extrae tres veces con un volumen igual de AcOEt. Las fases orgánicas se combinan, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 1:1).

(R, S)-3-(piridin-3-il-metil)-2-oxoindol²⁷ (3.6 a)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-2-oxoindoles, se parte de 250 mg (1.115 mmol) de **3.5 a**, obteniéndose 80 mg (31 %) de un sólido amarillo pálido. **P.f.** 115 – 117 °C (bibl. 139 – 142 °C). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 10.32 (s, 1H, NH), 8.34 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-Ar), 8.28 (s, 1H, H-Ar), 7.50 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-Ar), 7.21 (dd, *J* = 7.8, 4.7 Hz, 1H, H-Ar), 7.11 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-Ar), 7.04 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-Ar), 6.89 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-Ar), 6.71 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-Ar), 3.86 (t, *J* = 6.1

Hz, 1H, H3), 3.32 – 3.24 (m, 1H, CH₂), 3.07 (dd, *J* = 13.9, 6.7 Hz, 1H, CH₂). **HPLC**: *t_R* = 3.76 (98 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 225.3 [M+H]⁺.

(*R, S*)-3-((1*H*-pirrol-2-il)metil)indolin-2-ona (3.6 b)

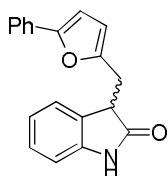


Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-2-oxoindoles, se parte de 400 mg de **3.6 b**, obteniéndose 110 mg (27 %) de un sólido amarillo.

P.f. 173 – 175 °C. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.21 (s, 1H, NH), 7.90 (s, 1H, NH), 7.30 – 7.03 (m, 4H, H-Ar), 6.89 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-Ar), 6.74 (m, 1H, H-Ar), 6.12 (m, 1H, H-Ar), 5.97 (m, 1H, H3), 3.76 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, CH₂), 3.31 – 3.21 (m, 1H, CH₂).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 178.58, 140.49, 131.15, 128.12, 127.00, 124.62, 123.51, 117.59, 110.94, 108.44, 103.92, 40.30, 28.19. **HPLC**: *t_R* = 3.73 (98 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 213.0 [M+H]⁺.

(*R, S*)-3-(5-fenilfuran-2-il-metil)-2-oxo-indol (3.6 c)

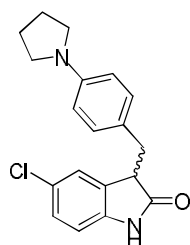


Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-2-oxoindoles, se parte de 500 mg de **3.5 c**, obteniéndose 226 mg (45 %) de un sólido naranja pálido.

P.f. 201 – 203 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10.43 (s, 1H, NH), 7.53 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH-C-furilo), 7.36 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH-CH-C-furilo), 7.23 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-Ar), 7.14 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-Ar), 7.02 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-Ar), 6.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-Ar), 6.79 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-Ar), 6.75 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-Ar), 6.54 (m, 1H, H-Ar), 6.11 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H3), 3.83 (dd, *J* = 7.3, 4.9 Hz, 1H, CH₂), 3.10 (dd, *J* = 15.4, 7.4 Hz, 1H, CH₂).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 178.19, 152.43, 151.97, 143.09, 130.70, 129.21, 129.10, 128.10, 127.38, 124.45, 123.35, 121.46, 109.53, 109.47, 106.73, 44.61, 28.37. **HPLC**: *t_R* = 4.92 (98 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 290.0 [M]⁺.

(*R, S*)-5-cloro-3-[(4-pirrolidin-1-il)-bencil]-2-oxo-indol (3.6 d)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-2-oxoindoles, se parte de 150 mg de **3.5 d**, obteniéndose 75 mg (50 %) de un aceite anaranjado.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.04 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-Ar), 7.43 – 7.37 (m, 2H, H-Ar), 7.31 – 7.22 (m, 2H, H-Ar), 6.64 – 6.58 (m, 2H, H-Ar), 4.24 – 4.17 (m, 1H), 3.88 (dd, *J* = 9.4, 7.6 Hz, 2H), 3.67 – 3.53 (m, 2H), 3.48 – 3.21 (m, 2H), 3.09 – 2.94 (m, 1H), 2.13 (m, 2H), 1.79 – 1.30 (m, 2H).

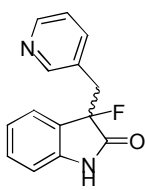
¹³C RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 178.25, 149.90, 139.61, 132.21, 130.19, 129.75, 129.47, 129.30, 124.55,

115.77, 112.16, 49.15, 47.32, 34.51, 25.39. **HPLC:** $t_R = 3.40$ (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 323.2 $[M-2H]^+$.

Procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-3-fluoro-2-oxoindoles

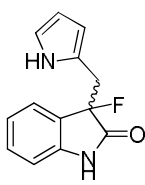
A una disolución del correspondiente 3-(arilmetil)-2-oxoindol (1 eq.) en MeOH (5 mg/mL) enfriada hasta 0 °C con baño de hielo se añade *Selectfluor* (2 eq.) poco a poco. La mezcla se agita a 0 °C durante unas 6 – 7 h. Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 1:1).

(*R*, *S*)-3-fluoro-3-(piridin-3-il-metil)-2-oxoindol (3.7 a)



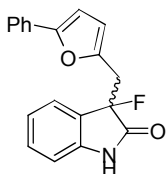
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-3-fluoro-2-oxoindoles, se parte de 100 g (0.412 mmol) de **3.6 a**, obteniéndose 22 mg (20 %) de un sólido amarillo pálido. **P.f.** 107 – 110 °C. **1H RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.49 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H6'), 8.29 (s, 1H, H2'), 7.87 (s, 1H, NH), 7.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H4), 7.20 (m, 2H), 7.03 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H), 6.78 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H7), 3.55 (dd, $J = 13.7, 10.6$ Hz, 1H, CH_2), 3.27 (dd, $J = 21.1, 13.6$ Hz, 1H, CH_2). **^{13}C RMN** (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 179.7 (d, $J = 34.2$ Hz, C2), 154.5 (C2'), 147.8, 143.4, 133.2, 132.0, 128.7, 125.2, 124.3, 121.3, 119.5 (d, $J = 31.9$ Hz, C8), 107.6, 99.8 (d, $J = 268.3$ Hz, C3), 41.6 (d, $J = 28.0$ Hz, CH_2). **HPLC:** $t_R=1.75$ (96 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 241.3 $[M-H]^+$. **Análisis elemental:** Calc. para $C_{14}H_{11}FN_2O$: C 69.41, H 4.58, N 11.56. Medido: C 69.13, H 4.86, N 12.01.

(*R*, *S*)-3-fluoro-3-(pirrol-2-il-metil)-2-oxoindol (3.7 b)



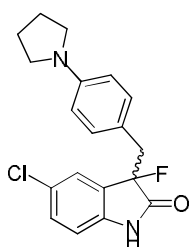
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-3-fluoro-2-oxoindoles, se parte de 100 mg (0.434 mmol) de **3.6 b**, obteniéndose 20 mg (18 %) de un sólido amarillo. **P.f.** 143 – 146 °C. **1H RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.21 (s, 1H, NH), 7.81 (dd, $J = 5.6, 3.4$ Hz, 1H, H4), 7.37 (m, 2H, H5+H6), 7.25 (dd, $J = 5.6, 3.5$ Hz, 1H, H7), 6.78 (dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1H, H5'), 6.29 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H4'), 6.02 (dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1H, H3'), 3.86 (dd, $J = 25.2, 12.4$ Hz, 1H, CH_2), 3.12 (dd, $J = 25.2, 12.4$ Hz, 1H, CH_2). **^{13}C RMN** (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 172.14 (d, $J = 34.2$ Hz, C2), 141.68, 133.22, 126.94, 124.77, 122.10, 120.49, 120.23, 117.41, 109.97, 107.44, 94.76 (d, $J = 268.3$ Hz, C3), 28.76 (d, $J = 28.0$ Hz, CH_2). **EM** (ES, modo positivo) m/z 4.84 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 231.8 $[M+H]^+$. **Análisis elemental:** Calc. para $C_{13}H_{11}FN_2O$: C 67.82, H 4.82, N 12.17. Medido: C 67.76, H 4.71, N 12.25.

(R, S)-3-fluoro-3-(5-fenilfuran-2-il-metil)-2-oxoindol (3.7 c)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-2-oxoindoles, se parte de 200 mg (0.651 mmol) de **3.6 c**, obteniéndose 40 mg (18 %) de un sólido amarillo. **P.f.** 215 – 218 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.85 (dd, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 1H), 7.88 – 7.74 (m, 2H), 7.59 (dt, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.55 – 7.39 (m, 4H), 7.27 (dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.77 (dd, *J* = 25.1, 12.4 Hz, 1H, CH₂), 3.42 (dd, *J* = 25.2, 12.4 Hz, 1H, CH₂). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.15 (d, *J* = 32.4 Hz, C2), 149.42, 144.16, 141.65, 129.34, 128.20, 127.84, 126.94, 124.77, 124.75, 122.10, 120.49, 120.23, 110.46, 109.97, 109.29, 93.60 (d, *J* = 268.1 Hz, C3), 33.37 (d, *J* = 26.7 Hz, CH₂). **HPLC**: *t*_R = 2.56 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 306.8 [M]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₁₉H₁₄FNO₂: C 67.82, H 4.82, N 4.56. Medido: C 67.76, H 4.59, N 4.16.

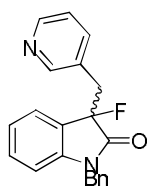
(R, S)-5-cloro-3-fluoro-3-[(4-pirrolidin-1-il)-bencil]-2-oxo-indol (3.7 d)



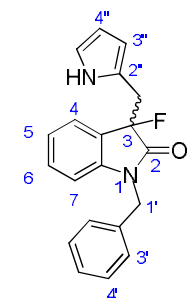
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-3-fluoro-2-oxoindoles, se parte de 50 mg (0.145 mmol) de **3.6 d**, obteniéndose 27 mg (53 %) de un aceite rojo. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.64 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H3'), 7.31 – 7.05 (m, 2H, H6+H7), 6.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H4), 6.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H4'), 3.46 (m, 2H, CH₂), 3.32 (t, *J* = 6.7 Hz, 4H, H7'), 2.03 – 1.92 (m, 4H, H8'). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.25 (d, *J* = 32.4 Hz, C2), 150.28, 141.22, 130.85, 129.57, 129.27, 129.11, 124.02, 121.55, 116.43, 111.07, 94.34 (d, *J* = 268.1 Hz, C3), 49.05 (N-CH₂), 39.97 (d, *J* = 27.7 Hz, CH₂), 25.36 (N-CH₂-CH₂). **HPLC**: *t*_R = 0.55 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 343.3 [M-H]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₁₉H₁₈ClFN₂O: C 66.18, H 5.26, N 8.12, Cl 10.28. Medido: C 66.42, H 4.96, N 7.89, Cl 10.31.

Procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-1-bencil-3-fluoro-2-oxoindoles

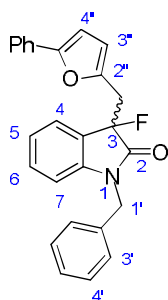
Se añade NaH (1.1 eq.) a una disolución del correspondiente 3-(arilmetil)-3-fluoro-2-oxoindol (1 eq.) en DMF anhidra (12 mg/mL) bajo agitación. Tras 10 min. a t.a., se añade BnBr (1 eq.) y se deja agitar la mezcla otros 15 min., tras lo cual se añade aproximadamente la mitad de volumen de *brine* a 0°C. Aparece un precipitado que se filtra y se lava con un poco más de *brine* frío y hexano y a continuación se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 1:3).

(R, S)-1-bencil-3-fluoro-3-(piridin-3-il-metil)-2-oxoindol (3.8 a)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-1-bencil-3-fluoro-2-oxoindoles, se parte de 100 mg (0.301 mmol) de **3.7 a**, obteniéndose 30 mg (21 %) de un sólido naranja. **P.f.** 115 - 118 °C. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.48 (d, J = 4.7 Hz, 1H, H3''), 8.26 (s, 1H, H5''), 7.46 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H7''), 7.23 – 6.93 (m, 9H, H-Ar), 6.58 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H7), 4.94 (d, J = 15.9 Hz, 1H, H1'), 4.60 (d, J = 15.7 Hz, 1H, H1'), 3.68 – 3.54 (m, 1H, H1''), 3.48 – 3.31 (m, 1H, H1''). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 164.36 (d, J = 31.5 Hz, C2), 149.85, 143.69, 136.87, 130.97, 128.57, 127.62, 127.29, 124.84, 124.23, 123.00, 122.97, 108.91 (C-Ar), 96.18 (d, J = 268.1 Hz, C3), 45.91, 38.17, 36.91 (d, J = 26.7 Hz, F-C-CH₂). **HPLC**: t_R = 3.72 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 333.2 [M-H]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₂₁H₁₇FN₂O: C 75.89, H 5.16, N 8.43. Medido: C 76.12, H 5.43, N 8.37.

(R, S)-1-bencil-3-fluoro-3-((1H-pirrol-2-il)metil)-2-oxoindol (3.8 b)

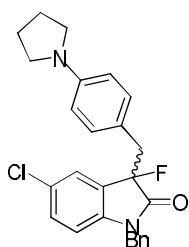
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-1-bencil-3-fluoro-2-oxoindoles, se parte de 50 mg (0.156 mmol) de **3.7 b**, obteniéndose 10 mg (15 %) de un sólido beige. **P.f.** 121 – 124 °C. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7.80 (m, 1H, H4), 7.38 – 7.11 (m, 9H), 6.28 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H5''), 5.99 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H4''), 5.81 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H3''), 5.53 – 5.47 (m, 1H, CH₂-Ph), 5.33 – 5.26 (m, 1H, CH₂-Ph), 3.65 (dd, J = 25.2, 12.3 Hz, 1H, CH₂-C-F), 3.42 (dd, J = 25.1, 12.4 Hz, 1H, CH₂-C-F). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 178.9 (d, J = 29.8 Hz, C2), 140.7, 139.3, 130.1, 129.5, 129.0, 127.6, 126.6, 124.4, 120.5, 117.6, 116.0, 108.0, 107.4, 106.1, 90.0 (d, J = 269.0 Hz, C3), 49.2 (C1'), 22.8 (d, J = 27.6 Hz, FC-CH₂). **HPLC**: t_R = 3.39 (99.9 %) **EM** (ES, modo positivo) m/z 323.1 [M+2H]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₂₀H₁₇FN₂O: C 74.98, H 5.35, N 8.74. Medido: C 75.25, H 4.93, N 8.81.

(R, S)-3-fluoro-3-(5-fenilfuran-2-il-metil)-2-oxoindol (3.8 c)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-1-bencil-3-fluoro-2-oxoindoles, se parte de 40 mg (0.101 mmol) de **3.7 c**, obteniéndose 20 mg (39 %) de un sólido amarillo. **P.f.** 170 – 173 °C. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7.74 (J = 6.4 Hz, 1H, H4), 7.69 – 7.14 (m, 13H), 6.85 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H4'), 6.51 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H3'), 6.01 (m, 1H, CH₂-Ph), 5.23 (m, 1H, CH₂-Ph), 3.63 (dd, J = 25.2, 12.3 Hz, 1H, CH₂-C-F), 3.45 (dd, J = 25.1, 12.4 Hz, 1H, CH₂-C-F). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 173.6 (d, J = 32.3 Hz, C2), 150.5, 148.9,

144.6, 136.8, 130.5, 129.5, 129.0, 128.2, 127.6, 126.8, 124.4, 124.3, 122.5, 122.4, 122.2, 121.9, 121.5, 108.5, 108.3, 106.3, 95.3 (d, $J = 271.3$ Hz, C3), 46.0 (C1'), 32.8 (d, $J = 27.6$ Hz, FC-CH₂). **HPLC**: $t_R = 5.38$ (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 342.0 (100%), 398.3 [M+H]⁺, (60%). **Análisis elemental**: Calc. para C₂₆H₂₀FNO₂: C 78.57, H 5.07, N 3.52. Medido: C 78.33, H 4.98, N 3.66.

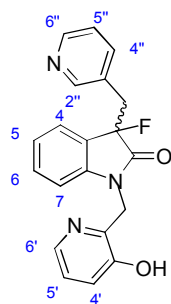
1-bencil-3-fluoro-3-(piridin-3-il-metil)-2-oxoindol (3.8 d)



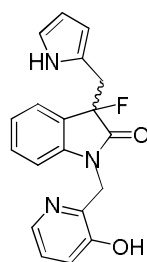
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-1-bencil-3-fluoro-2-oxoindoles, se parte de 50 mg (0.115 mmol) de **3.7 d**, obteniéndose 30 mg (47 %) de un aceite naranja. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.61 (dd, $J = 7.5, 2.0$ Hz, 1H, H6), 7.51 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H7), 7.36 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H4), 7.29 - 7.20 (m, 5H), 7.08 - 7.02 (m, 2H), 6.61 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H3''), 5.73 (m, 1H, CH₂-Ph), 5.24 (m, 1H, CH₂-Ph), 3.89 (m, 2H, H6''), 3.70 - 3.56 (m, 3H), 2.98 (m, 1H, CH₂-CF), 2.20 - 2.11 (m, 2H, H7''), 1.73 - 1.61 (m, 2H, H7'). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 173.21 (d, $J = 32.4$ Hz, C2), 150.60, 143.23, 136.82, 131.51, 131.07, 130.03, 128.57, 127.66, 127.55, 127.51, 124.45, 124.20, 121.31, 116.60, 110.10, 95.68 (d, $J = 268.1$ Hz, C3), 49.15 (N-CH₂), 45.98 (CH₂-Ph), 39.94 (d, $J = 26.7$ Hz, F-C-CH₂), 25.39 (N-CH₂-CH₂). **HPLC**: $t_R = 4.69$ (98 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 432.2 [M-2H]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₂₁H₁₇FN₂O: C 75.89, H 5.16, N 8.43. Medido: C 76.12, H 5.43, N 8.66.

Procedimiento general de síntesis de 3-fluoro-1-((3-hidroxipiridin-2-il)metil)-3-(arilmetil)-2-oxoindol

A una disolución del correspondiente 3-(arilmetil)-3-fluoro-2-oxoindol (1 eq.) en DMF anhidra (12 mg/mL) se añade NaH (1.1 eq.) bajo agitación. Tras 10 min. a t.a., se añade hidrocloreuro de 2-bromometil-3-hidroxipiridina (1 eq.) y se deja agitar la mezcla a t.a. durante 2 h. Una vez terminada la reacción, se añade la mitad de volumen de una disolución saturada de NaCl a 0 °C. Aparece un precipitado que se filtra y se lava con un poco más de una disolución saturada de NaCl en frío y hexano y se deja secar.

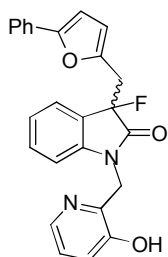
(R, S)-3-fluoro-1-((3-hidroxipiridin-2-il)metil)-3-(piridin-3-il-metil)-2-oxoindol (3.8 e)

Seguendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-3-fluoro-1-((3-hidroxipiridin-2-il)metil)-2-oxoindol, se parte de 100 mg (0.286 mmol) de **3.7 a**, obteniéndose 4 mg (9 %) de un sólido amarillo. **P.f.** 172 – 175 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.40 – 8.33 (m, 2H), 8.30 (d, *J* = 4.9, 1H, H6'), 7.76 (t, *J* = 8.1, 1H, H4''), 7.34 – 7.16 (m, 7H), 5.87 (s, 1H, OH), 5.55 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, CH₂-pyr), 5.29 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH₂-pyr), 3.69 (dd, *J* = 25.1, 12.5 Hz, 1H, CH₂-CF), 3.11 (dd, *J* = 25.1, 12.5 Hz, 1H, CH₂-CF). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 164.36 (d, *J* = 31.5 Hz, C2), 151.36, 149.85, 148.95, 143.84, 143.66, 139.45, 130.97, 128.49, 127.34, 125.77, 124.84, 124.48, 124.23, 123.75, 122.97, 120.62, 108.91, 96.18 (d, *J* = 268.1 Hz, C3), 41.52, 36.91 (d, *J* = 26.7 Hz, F-C-CH₂). **HPLC**: *t_R* = 4.96 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 355.4 [M+5H]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₂₀H₁₆FN₃O₂: C 68.76, H 4.62, N 12.03. Medido: C 69.02, H 4.56, N 12.10.

(R, S)-3-fluoro-1-((3-hidroxipiridin-2-il)metil)-3-(pirrol-2-il)metil-2-oxoindol (3.8 f)

Seguendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-3-fluoro-1-((3-hidroxipiridin-2-il)metil)-2-oxoindol, se parte de 10 mg (0.030 mmol) de **3.7 b**, obteniéndose 3 mg (21 %) de un sólido amarillo. **P.f.** 123 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.24 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H6'), 8.00 (s, 1H, NH), 7.68 (dd, *J* = 7.1, 2.3 Hz, 1H, H4), 7.38 – 7.06 (m, 5H), 6.56 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H5''), 6.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H4''), 5.89 – 5.80 (m, 2H), 5.46 (s, 2H, CH₂-pyr), 3.72 (dd, *J* = 25.2, 12.3 Hz, 1H, CH₂-CF), 3.43 (dd, *J* = 25.2, 12.4 Hz, 1H, CH₂-CF). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 164.17 (d, *J* = 32.4 Hz, C2), 151.36, 143.84, 143.66, 139.45, 133.22, 128.49, 125.77, 124.84, 124.48, 124.23, 122.97, 120.62, 117.41, 108.91, 107.44, 107.30, 96.87 (d, *J* = 268.1 Hz, C3), 41.52, 27.74 (d, *J* = 26.7 Hz, F-C-CH₂). **HPLC**: *t_R* = 4.95 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 341.3 [M+3H]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₁₉H₁₆FN₃O₂: C 67.65, H 4.78, N 12.46. Medido: C 67.82, H 4.85, N 12.58.

(R, S)-3-((5-fenilfuran-2-il)metil-3-fluoro-1-((3-hidroxipiridin-2-il)metil)-2-oxoindol (3.8 g)



Seguendo el procedimiento general de síntesis de 3-(arilmetil)-3-fluoro-1-((3-hidroxipiridin-2-il)metil)-2-oxoindol, se parte de 15 mg (0.049 mmol) de **3.7 c**, obteniéndose 6 mg (30 %) de un aceite naranja. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.34 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H6'), 7.79 – 7.19 (m, 8H), 6.81 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H4''), 6.24 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H3''), 5.87 (s, 1H, OH), 5.56 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, CH₂-pyr), 5.31 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, CH₂-pyr), 3.66 (dd, *J* = 25.1, 12.4 Hz, 1H, CH₂-CF), 3.20 (dd, *J* = 25.2, 12.3 Hz, 1H, CH₂-CF). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 164.17 (d, *J* = 32.4 Hz, C2), 151.36, 149.42, 144.16, 143.84, 143.66, 139.45, 129.34, 128.49, 128.20, 127.84, 125.77, 124.84, 124.75, 124.48, 124.23, 122.97, 120.62, 110.46, 109.29, 108.91, 95.30 (d, *J* = 268.1 Hz, C3), 41.52, 32.90 (d, *J* = 27.7 Hz, F-C-CH₂). HPLC: *t_R* = 3.88 (95 %). EM (ES, modo positivo) *m/z* 412.1 [M-2H]⁺. Análisis elemental: Calc. para C₂₅H₁₉FN₂O₃: C 72.45, H 4.62, N 6.76. Medido: C 72.37, H 4.25, N 6.81.

3.5.3 Ensayos in vitro de activación de AMPK

La actividad de la enzima AMPK en los ensayos de activación *in vitro* se evaluó usando una metodología basada en tecnología *Delfia*²⁸. Las actividades de la enzima se midieron en placas microtituladoras en presencia de un péptido sustrato sintético (AMARAASAAALARRR, o péptido "AMARA") y activadores en diluciones en serie. Las reacciones se iniciaron a través de la adición de AMPK. La actividad de la enzima se mide usando un anticuerpo antifosfoserina para medir la cantidad de fosfato incorporado a "AMARA". Buffer de reacción: Hepes 50 mM; pH=7.4; [ATP]=125mM; [MgCl₂]=19mM; Incubación de 30 min. a 30 °C.

3.5.4 Ensayos de viabilidad celular

Líneas celulares

Las células PNT2 (Sigma, St. Louis, MO, USA), PC-3 (ATCC CRL-1435) y HepG2 (ATCC, HB-8065) fueron crecidas de manera rutinaria en frascos de cultivo con RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL; Escocia,) en presencia de 1 % de solución de antibiótico (penicilina G 100 UI/ml, sulfato de estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina B 0,25

µg/ml de Invitrogen; Paisley, Reino Unido) y se mantuvieron a 37 °C en un ambiente húmedo y con un 5 % de CO₂.

Determinación de la viabilidad celular

Después de la incubación con los diferentes compuestos se añadieron 100 µL de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazol) durante 1 h, y el precipitado formado se solubilizó con 200-500 µL de isopropanol. Posteriormente se midió la absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro de placas (ELX 800 *Bio-Tek Instruments*, INC).

3.5.5 Ensayos de activación en células de AMPK

Para la obtención de proteínas, se levantaron las células de la placa con tampón de homogeneización (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, triton X100, Na₃VO₄ 1 mM, β-glicerofosfato 10 mM, NaF 5 mM, leupeptina 2 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, PMSF 0.1 mM) mediante raspado en hielo. Posteriormente, las muestras se dejaron a 4 °C durante 15 min. Inmediatamente después se centrifugaron a 15000 rpm durante 10 min a 4 °C, recogiendo el sobrenadante. Las muestras (20 µg de proteínas) se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) al 10 % o 15 %, utilizando un tampón de electroforesis compuesto por Tris 25 mM, pH 8,3, Glicina 0,2 M y SDS 0,1 %. Se utilizaron marcadores de bajo peso molecular de *Lonza Group Ltd* (Basilea, Suiza), detectando posteriormente la proteína de interés mediante *Western blot*. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas en las placas fotográficas se realizó con el programa *Scion Image* (*Scion Corporation*, Maryland, USA). Los anticuerpos primarios p-AMPKα1-thr172, p-ACC-ser79 AMPK, ACC y β-tubulina fueron obtenidos de *Cell Signaling Technology* (Danvers, Maryland, USA). Como anticuerpos secundarios se han utilizado los siguientes anticuerpos conjugados con peroxidasa: IgG anti-mouse de Sigma (St. Louis, USA), IgG *anti-rabbit* de *Cell Signaling* (*Cell Signaling Technology*, Maryland, USA).

Bibliografía del capítulo 3

1. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646-674.
2. Brooks Robey, R., Weisz, J., Kuemmerle, N., Salzberg, A. C., Berg, A., Brown, D. G., Kubik, L., Palorini, R., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Colacci, A., Mondello, C., Raju, J., Woodrick, J., Ivana Scovassi, A., Singh, N., Vaccari, M., Roy, R., Forte, S., Memeo, L., Salem, H. K., Amedei, A., Hamid, R. A., Williams, G. P., Lowe, L., Meyer, J., Martin, F. L., Bisson, W. H., Chiaradonna, F., Ryan, E. P., Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: Cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? *Carcinogenesis* **2015**, *36*, S203-S231.
3. Formentini, M.; Romano, P., Using value analysis to support knowledge transfer in the multi-project setting. *International Journal of Production Economics* **2011**, *131* (2), 545-560.
4. Formentini, L.; Martínez-Reyes, I.; Cuezva, J. M., The mitochondrial bioenergetic capacity of carcinomas. *IUBMB life* **2010**, *62* (7), 554-560.
5. Dang, C. V., Links between metabolism and cancer. *Genes and Development* **2012**, *26* (9), 877-890.
6. Dandapani, M.; Hardie, D. G., AMPK: Opposing the metabolic changes in both tumour cells and inflammatory cells. *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41* (2), 687-693.
7. Salt, I. P.; Palmer, T. M., Exploiting the anti-inflammatory effects of AMP-activated protein kinase activation. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2012**, *21* (8), 1155-1167.
8. Salminen, A.; Hyttinen, J. M. T.; Kaarniranta, K., AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: Impact on healthspan and lifespan. *Journal of Molecular Medicine* **2011**, *89* (7), 667-676.
9. Pang, T.; Zhang, Z. S.; Gu, M.; Qiu, B. Y.; Yu, L. F.; Cao, P. R.; Shao, W.; Su, M. B.; Li, J. Y.; Nan, F. J.; Li, J., Small molecule antagonizes autoinhibition and activates AMP-activated protein kinase in cells. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283* (23), 16051-16060.
10. Chen, L.; Feng, L.; Huang, M.; Li, J.; Nan, F.; Pang, T.; Yu, L.; Zhang, M. Preparation of alkene oxindole derivatives as activators of AMP activated protein kinase. WO2011033099A1, **2011**, F. Hoffmann-La Roche AG, Switz. .

11. Chen, L.; Huang, M.; Feng, L.; He, Y.; Yun, H. Spiro-cyclopropane-indolinone derivatives as AMPK modulators and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of diseases. WO2011069298A1, **2011**, F. Hoffmann-La Roche AG, Switz. .
12. Li, Y. Y.; Yu, L. F.; Zhang, L. N.; Qiu, B. Y.; Su, M. B.; Wu, F.; Chen, D. K.; Pang, T.; Gu, M.; Zhang, W.; Ma, W. P.; Jiang, H. W.; Li, J. Y.; Nan, F. J.; Li, J., Novel small-molecule AMPK activator orally exerts beneficial effects on diabetic db/db mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2013**, 273 (2), 325-334.
13. Nan, F.; Yu, L.; Zhang, M.; Chen, L.; Huang, M.; Feng, L.; Li, J.; Pang, T. Preparation of alkene oxindole derivatives as activators of AMP activated protein kinase. WO2011032320A1, **2011**, F. Hoffmann-La Roche AG, Switz. .
14. Laderoute, K. R.; Calaoagan, J. M.; Madrid, P. B.; Klon, A. E.; Ehrlich, P. J., SU11248 (sunitinib) directly inhibits the activity of mammalian 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK). *Cancer Biology and Therapy* **2010**, 10 (1), 68-75.
15. Cheng, L.; Liu, L.; Wang, D.; Chen, Y. J., Highly enantioselective and organocatalytic α -amination of 2-Oxindoles. *Organic Letters* **2009**, 11 (17), 3874-3877.
16. Nyffeler, P. T.; Durón, S. G.; Burkart, M. D.; Vincent, S. P.; Wong, C. H., Selectfluor: Mechanistic insight and applications. *Angewandte Chemie - International Edition* **2004**, 44 (2), 192-212.
17. Peng, W.; Shreeve, J. M., Convenient fluorination of nitro and nitrile compounds with Selectfluor. *Tetrahedron Letters* **2005**, 46 (29), 4905-4909.
18. Overman, L. E.; Peterson, E. A., Enantioselective synthesis of (-)-idiospermuline. *Tetrahedron* **2003**, 59 (35), 6905-6919.
19. Zadra, G.; Photopoulos, C.; Tyekucheva, S.; Heidari, P.; Weng, Q. P.; Fedele, G.; Liu, H.; Scaglia, N.; Priolo, C.; Sicinska, E.; Mahmood, U.; Signoretti, S.; Birnberg, N.; Loda, M., A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis. *EMBO Molecular Medicine* **2014**, 6.
20. Fay, J. R.; Steele, V.; Crowell, J. A., Energy homeostasis and cancer prevention: The AMP-activated protein kinase. *Cancer Prevention Research* **2009**, 2 (4), 301-309.

21. Chuang, H. C.; Chou, C. C.; Kulp, S. K.; Chen, C. S., AMPK as a potential anticancer target - friend or foe? *Current Pharmaceutical Design* **2014**, 20 (15), 2607-2618.
22. Dasgupta, B.; Chhipa, R. R., Evolving Lessons on the Complex Role of AMPK in Normal Physiology and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* **2016**, 37 (3), 192-206.
23. Omar, H. A.; Berman-Booty, L.; Weng, J. R., Energy restriction: Stepping stones towards cancer therapy. *Future Oncology* **2012**, 8 (12), 1503-1506.
24. Indolinone derivatives and their use in treating disease-states such as cancer. US2005/90541, **2005**, Schering, Aktiengesellschaft.
25. Method of Treating Transplant Rejection and Autoimmune Diseases. US2014/50694, **2014**, Wisconsin Alumni Research Foundation.
26. Novel therapeutic use of indolinone derivatives. WO2005/58309, **2005**, Leo Pharma, A. S.
27. Grigg, R.; Whitney, S.; Sridharan, V.; Keep, A.; Derrick, A., Iridium catalysed C-3 alkylation of oxindole with alcohols under solvent free thermal or microwave conditions. *Tetrahedron* **2009**, 65 (22), 4375 - 4383.
28. Thienopyridone derivatives useful as activators of AMPK. EP2679591, **2014**,

CAPITULO 4

COMPUESTOS ESPIRÁNICOS DERIVADOS DE INDOLINA-PIRAZOL-PIRIDONA COMO UNA NUEVA CLASE QUÍMICA DE REGULADORES DEL PROCESO DE ACTIVACIÓN DE AMPK

| | |
|---|-----|
| 4.1 Introducción y objetivos | 138 |
| 4.2 Resultados y discusión | 141 |
| 4.2.1 Identificación de los nuevos prototipos | 141 |
| A. Síntesis y evaluación del derivado de espiro [indolina-pirazol] piridinona. | 141 |
| B. Determinación del pK _a e implicaciones estructurales | 146 |
| C. Reacción de fluoración y evaluación biológica de los diastereómeros | 148 |
| D. Asignación estructural | 150 |
| 4.2.2 Optimización de los prototipos derivados de espiro [indolina-pirazol] piridinona | 152 |
| A. Síntesis | 152 |
| B. Estudios de activación enzimática frente a AMPK | 155 |
| C. Estudios de activación en células de AMPK | 157 |
| 4.2.3 Síntesis y evaluación biológica de derivados modificados de espiro-indolina | 159 |
| A. Espiro indolina-pirano-pirazoles | 159 |
| B. Espiro indolina-pirazol piridina | 160 |
| C. Espiro[indolina-piridinas] y espiro[indol-pirazol-piridinas] | 160 |
| D. Espiro indolina-piperidina | 161 |
| E. Evaluación biológica y estudios de relación estructura-actividad | 162 |
| 4.3 Estudio de fosforilación en células endoteliales | 163 |
| 4.4 Conclusiones | 165 |
| 4.5 Procedimientos experimentales | 166 |
| 4.5.1 Métodos generales | 166 |
| 4.5.2 Procedimientos de síntesis | 166 |
| 4.5.3 Ensayos in vitro de activación de AMPK | 191 |
| 4.5.4 Medidas de la activación en células de AMPK | 191 |
| 4.5.5 Ensayos de fosforilación de AMPK vascular | 193 |
| Bibliografía del capítulo 4 | 196 |

4. Compuestos espiránicos derivados de indolina-pirazol - piridona como una nueva clase química de reguladores del proceso de activación de AMPK.

4.1. Introducción y objetivos

Las reacciones multicomponente (MCR) son transformaciones químicas en las que tres o más reactivos de partida diferentes se combinan simultáneamente para originar un producto final que incorpora los rasgos estructurales de cada uno de ellos (**figura 4.1**). En las MCRs se puede conseguir generar una elevada complejidad estructural en un único paso de reacción, convirtiéndose en un método sintético sencillo y eficiente respecto a las reacciones convencionales. Además, las MCRs presentan numerosas ventajas desde el punto de vista de factores como tiempo, costes, eficiencia, selectividad, pues se consigue un elevado índice de formación de enlaces y gran economía de átomos puesto que la mayoría de ellos quedan integrados en la estructura del producto final. Son procesos de síntesis convergente, lo que se traduce en la mayoría de los casos en un mayor rendimiento global, comparado con una síntesis lineal de varias etapas¹.

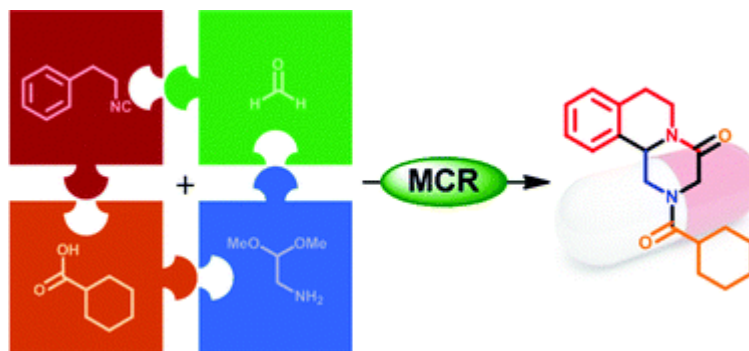


Figura 4.1. Las reacciones multicomponente aportan numerosas ventajas en el campo de la síntesis orgánica, y son una herramienta especialmente potente en el proceso de desarrollo de fármacos.

En las reacciones multicomponente, cada molécula que participa en una reacción añade un elemento de diversidad estructural al compuesto final, lo que permite generar un número muy elevado de productos diferentes. Por eso este tipo de reacciones son una herramienta habitual

en química combinatoria y síntesis orientada a la diversidad estructural, que juegan actualmente un importante papel en los programas de descubrimiento de nuevos fármacos²⁻³.

En el campo de la síntesis orgánica, destacan las numerosas aplicaciones de las MCRs, principalmente en la química heterocíclica⁴. En concreto, las isatinas, indolinas-2,3-dionas, aparecen como compuestos con grandes ventajas para ser empleadas en las MCRs debido a su versatilidad química. Esta versatilidad incluye un grupo de reacciones denominadas espirociclaciones, que permiten el acceso a compuestos de naturaleza espiránica a través de mecanismos similares⁵⁻¹⁰.

En nuestro caso, las espirociclaciones con isatinas son MCRs que nos van a permitir el ensamblaje a través de un carbono espiránico de dos estructuras privilegiadas en la modulación de AMPK: los oxoindoles, explotados a raíz del prototipo PT1, a los que se ha dedicado el capítulo 2, y las 3-ciano-piridonas fusionadas a compuestos π -excedentes, como el tiofeno en el caso de los derivados de los prototipos de Abbott¹¹ y Merck¹², o como el pirrol en el caso de los trabajos de GSK¹³, a los que se ha dedicado el capítulo 3. Esta fusión se esquematiza en la **figura 4.2**.

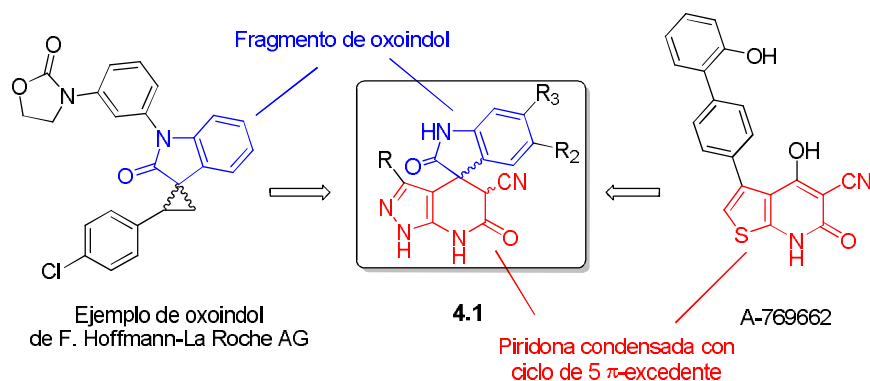


Figura 4.2. Estructura general de las espiro[indolina-pirazol-piridina] que se sintetizan en este capítulo, y que reúnen los dos tipos de estructuras privilegiadas de prototipos anteriores: 2-oxoindoles y piridonas unidas a anillos de 5-miembros π -excedentes.

En este capítulo se partirá de la síntesis tricomponente de la espiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina **4.1** (**figura 4.2**), que permite que un oxoindol quede anclado a una 3-cianopiridona, y este prototipo se tomará como punto de partida para el desarrollo de un programa de compuestos análogos en el que se pretende evaluar la actividad moduladora de AMPK. Los compuestos que se proponen surgen tanto de la introducción de sustituyentes de diferente

naturaleza en el prototipo **4.1** como de la síntesis de heterociclos diferentes, accesibles también a través de espirociclaciones partiendo de isatinas.

Las modificaciones propuestas se recogen en la **figura 4.3**, en la que se aprecian algunas de las características en común que tienen estas reacciones. En todas se necesita un compuesto con un metileno ácido, como un β -cetonitrilo o el malononitrilo (en rojo en la **figura 4.3**). Esto determinará la formación de una piridona o de una piridina. Este compuesto condensa, por un lado, con un nucleófilo (en verde en la figura), y con la isatina (en azul). La condensación con el nucleófilo es una adición al carbonilo o al nitrilo, y es el paso que forma el anillo de piridona o piridina. Si el nucleófilo es un compuesto heterocíclico (amino o hidroxipirazol), resultará un biciclo fusionado, mientras que si es un compuesto lineal (acetamida), el resultado será una piridona o piridina sin fusionar, que nos permitirá evaluar la contribución a la modulación de AMPK de estos ciclos por separado.

La condensación con la isatina (en azul en la **figura 4.3**), es la que origina el centro espiránico. El carbonilo en 3 de la isatina es atacado electrófilamente en dos ocasiones: primero por el metileno activo del β -cetonitrilo, y segundo por el nucleófilo.

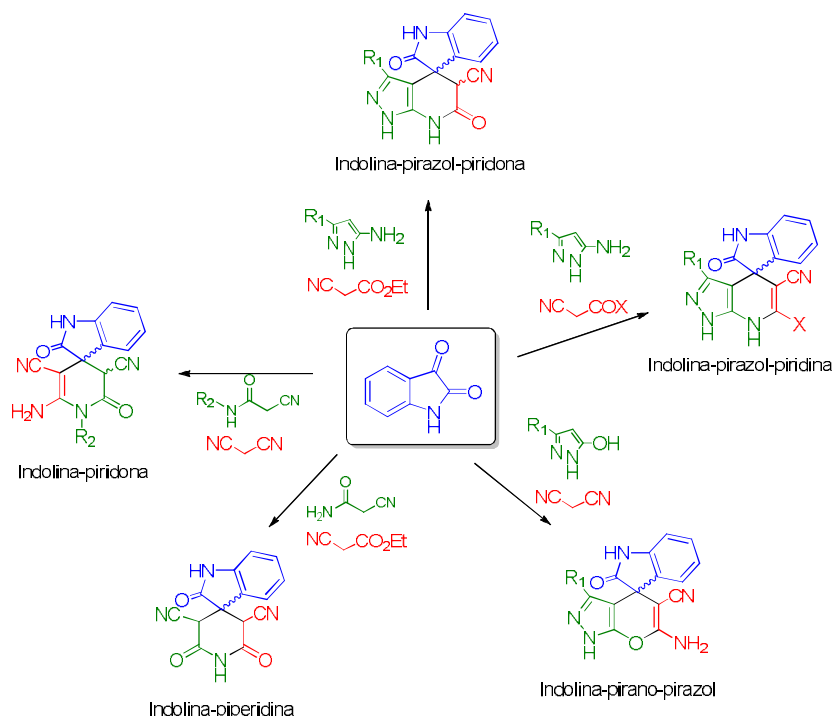


Figura 4.3. Versatilidad de las isatinas a través de reacciones de espirociclación.

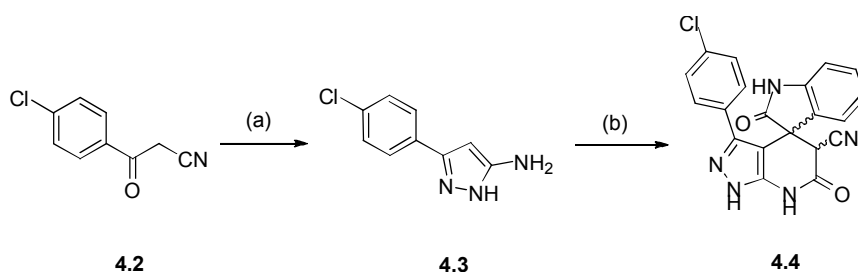
Usando esta versátil herramienta sintética, se persigue preparar una pequeña quimioteca de compuestos sobre los cuales se pueda basar un estudio de las relaciones estructura-actividad que en definitiva puedan contribuir a los objetivos globales de este trabajo: servir como base para el desarrollo de futuros candidatos a fármacos basados en la interacción con AMPK y que aprovechen su potencialidad como diana farmacológica, y contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares a través de los cuales esta proteína despliega sus cruciales funciones en el organismo.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1 Identificación de los nuevos prototipos

A. Síntesis y evaluación del derivado de espiro [indolina-pirazol] pirididona

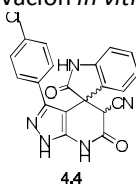
Para la síntesis del derivado de indolina-pirazol-piridona **4.4** fue preciso, en primer lugar, preparar el 5-aminopirazol **4.3** (**esquema 4.1**)¹. Esto se consigue mediante la condensación del 4-clorobenzoilacetonitrilo (**4.2**) con hidrazina a reflujo en EtOH durante una noche. Este 5-aminopirazol se suspende en agua junto con la isatina, añadiendo a la mezcla cianoacetato de etilo y una cantidad catalítica de base. Las condensaciones que tienen lugar para la espirociclación pueden estar catalizadas tanto por ácidos como por bases. En nuestro caso, se optó por trietilamina en una proporción del 10% molar porque fue la que estaba descrita con mejores rendimientos¹. El compuesto **4.4**, que precipita en el medio de reacción, se consiguió aislar con un 75 % de rendimiento.



Esquema 4.1. Síntesis de la espiro [indolina-pirazol] piridona **4.4**. Reactivos y condiciones: (a) Hidrato de hidrazina (1 eq.), EtOH, ref., 8h, 66 %; (b) Isatina (1 eq.), cianoacetato de etilo (1 eq.), TEA (10 %mol), agua, 90 °C, 8h, 75 %.

La evaluación biológica del compuesto **4.4** se llevó a cabo a través de un ensayo enzimático fluorométrico con la isoforma de AMPK recombinante $\alpha 1\beta 1\gamma 2$. Este ensayo evalúa la capacidad de fosforilación de AMPK al péptido sustrato AMARAASAAALARRR. El compuesto fue evaluado a concentración 30 μ M, utilizando como control del ensayo el activador endógeno, AMP, y el activador descrito por Abbott, A-769662. Los resultados revelaron que, a la concentración ensayada, el compuesto **4.4** presenta un prometedor valor de activación enzimática de 512 % (**tabla 4.1**).

Tabla 4.1. Resultados de activación *in vitro* de AMPK ($\alpha 1\beta 1\gamma 2$) con **4.4**.



| Compuesto | % activación, 30 μ M | % activación, 200 μ M |
|------------|--------------------------|---------------------------|
| AMP | | 432 - 440 |
| A-769662 | 724 - 776 | - |
| 4.4 | 512 | - |

Estos interesantes resultados obtenidos constituyen el punto de partida para un estudio más exhaustivo alrededor de este prototipo.

Desde el punto de vista del mecanismo de reacción, la reacción de espirociclación no es estereoespecífica, por lo que es de esperar que el compuesto **4.4** haya sido obtenido como mezcla de dos parejas diastereoméricas. El espectro de ^1H -RMN en DMSO- d_6 , mostrado en la **figura 4.4**, evidencia este resultado. En la zona entre 5.0 y 5.5 ppm, desplazamiento correspondiente al protón unido al carbono 5', aparecen dos señales, a 4.94 y 5.37 ppm, en una proporción aproximadamente 2:1 a favor de la segunda. Esto quiere decir que existe una mezcla de dos parejas de diastereómeros con un exceso diastereomérico (e.d.) del 50 %.

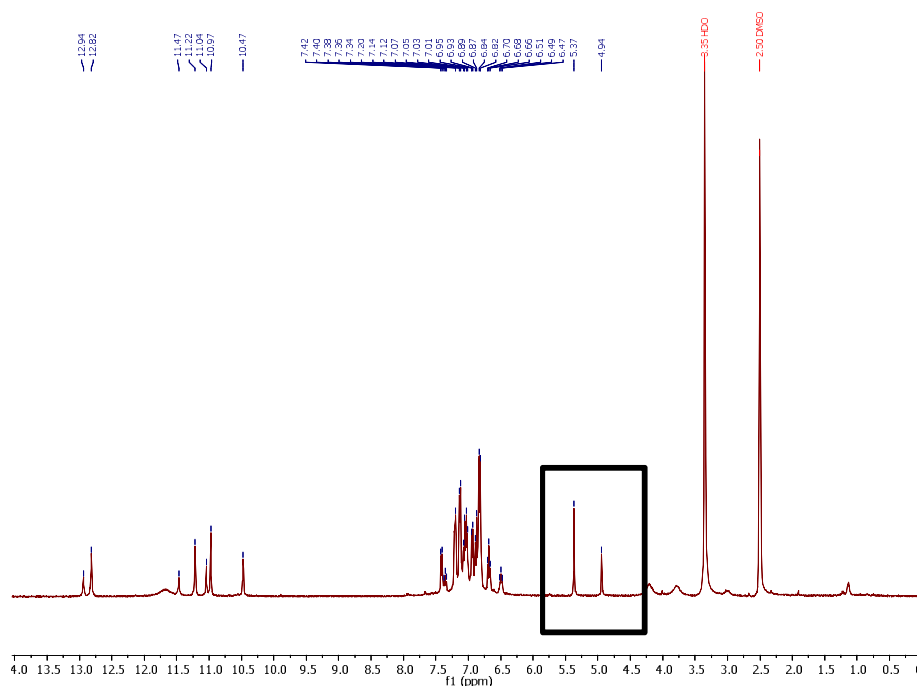
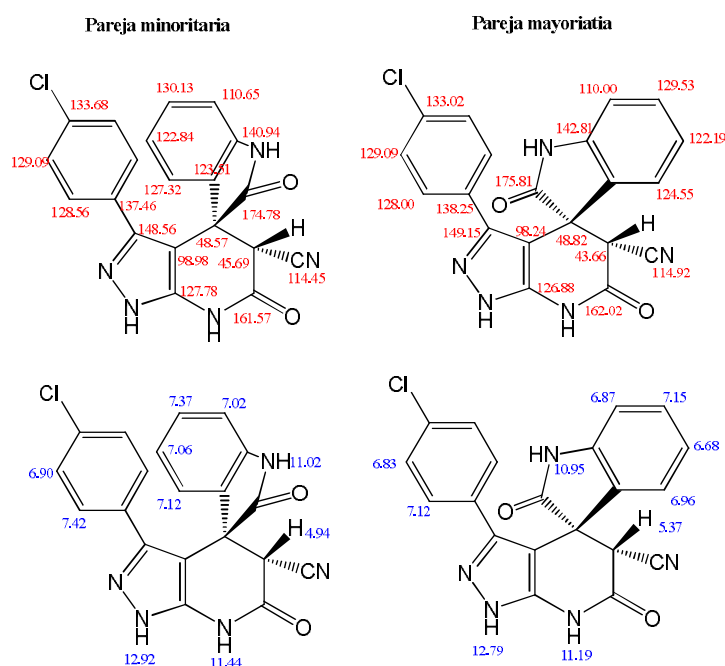


Figura 4.4. Espectro de ^1H -RMN de **4.4** en DMSO-d_6 .

Para la asignación inequívoca de los desplazamientos de ^1H y ^{13}C de cada pareja diastereomérica de **4.4**, fueron determinantes los experimentos bidimensionales COSY (*CORrelation SPECTROSCOPY*), HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) y NOESY. Combinados con los espectros monodimensionales, permitieron detectar las correlaciones clave. Estas correlaciones se muestran en la **figura 4.5 (A) y (B)**.

(A)



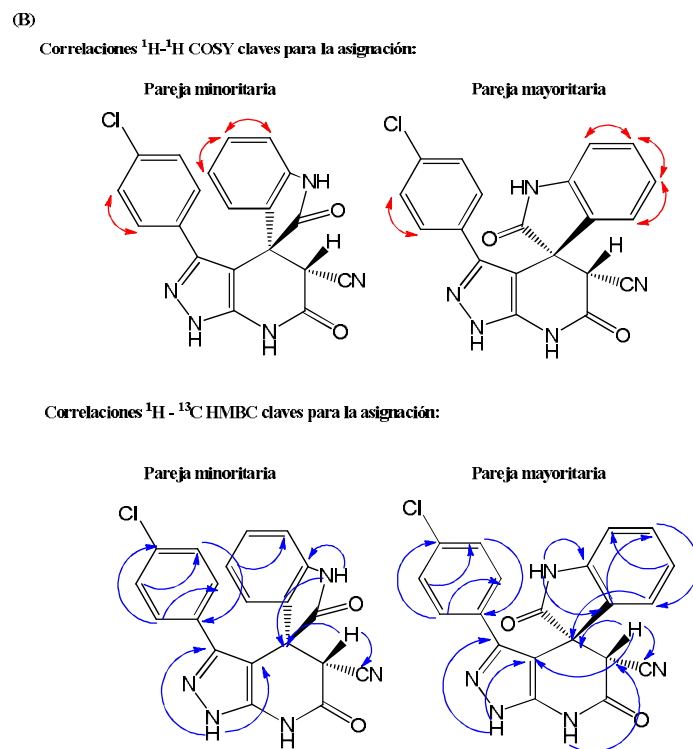


Figura 4.5. (A) Asignación inequívoca de los desplazamientos de ^1H y ^{13}C para las parejas diastereoméricas de **4.4**. **(B)** Correlaciones COSY y HMBC claves para la asignación inequívoca de los desplazamientos de ^1H y ^{13}C para las parejas diastereoméricas de **4.4**.

En el espectro NOESY, mostrado en la **figura 4.6**, se observa una correlación entre la señal a 5.37 ppm con las señales aromáticas, lo que indica que el protón en 5' está más próximo a los del anillo aromático del indol en esta pareja de diastereómeros. La señal aromática con la que correlaciona es el protón en posición 4 del anillo del indol, asignado mediante experimentos HSQC y HMBC, y que es además el que espacialmente se encuentra más próximo.

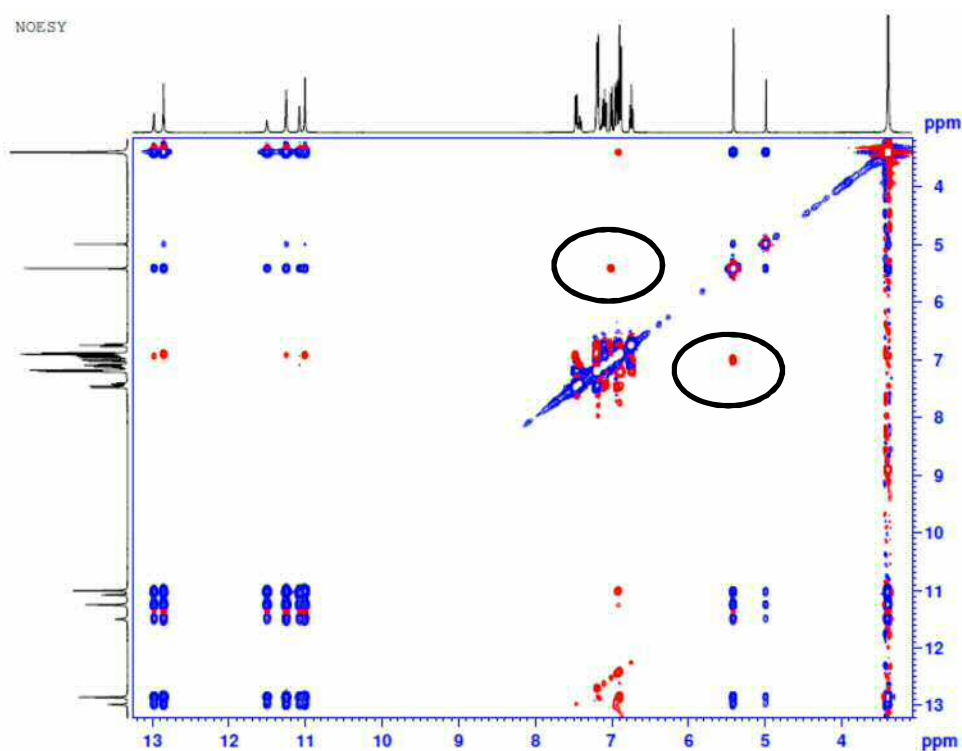


Figura 4.6. Espectro NOESY de **4.4** que ha permitido la asignación del isómero mayoritario y minoritario. Se observan las señales de correlación del protón a 5.37 ppm.

La **figura 4.7** muestra que esto sucede cuando el protón 5' y el anillo aromático del indol están al mismo lado del plano formado de la piridona. Además, esta pareja es la que parece menos impedida estéricamente, ya que es la que sitúa los sustituyentes más voluminosos, el ciano de posición 5 y el anillo aromático del indol, en lados opuestos de la piridona.

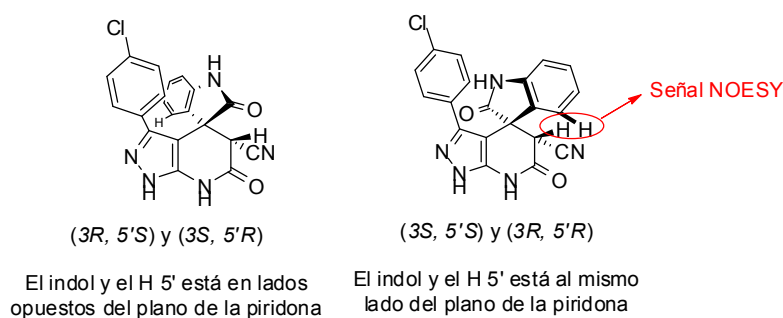


Figura 4.7. La pareja diastereomérica de **4.4** en la que el protón en 5' y el anillo aromático del indol están al mismo lado del plano formado por la piridona deben ser los que generen la señal NOESY.

B. Determinación del pK_a y de sus implicaciones estructurales.

En el espectro NOESY aparece otra correlación interesante: la que se establece entre las comentadas señales de la zona entre 5.0 y 5.5 ppm, correspondientes al H en 5', y los protones más desapantallados, correspondientes a los NH. Estas correlaciones tienen el mismo signo que la diagonal (color azul), lo que nos indica que son correlaciones de intercambio, y no de acoplamiento dipolar. Esto puede ser un indicio de que el H en 5' sea lábil.

Para corroborarlo, se llevó a cabo el registro del espectro ^1H -RMN en DMSO- d_6 tras la adición de agua deuterada. Los resultados se muestran en la **figura 4.8**. Los espectros muestran que, con la adición de agua, estas señales desaparecen, prueba inequívoca de su intercambio con el disolvente y, por tanto, de su labilidad.

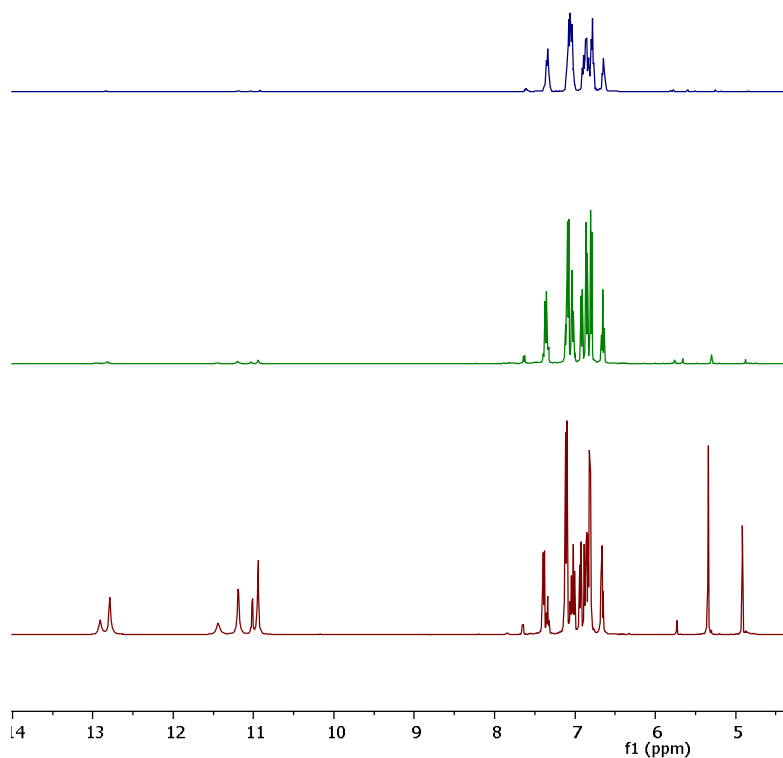
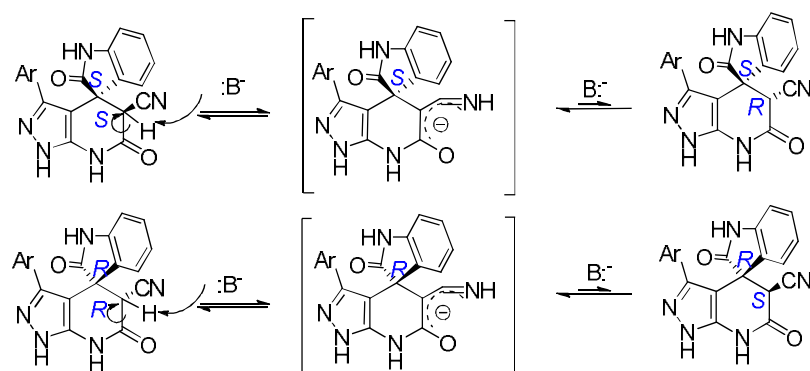


Figura 4.8. Espectros de ^1H -RMN de **4.4** antes (en rojo) y después (verde y azul) de la adición de agua deuterada.

Como resultado de esta labilidad, los estereoisómeros pueden estar en equilibrio entre sí a través de la protonación-desprotonación del carbono 5'.

Además, se llevó a cabo la determinación experimental de la acidez del compuesto en base a la medida de su pK_a mediante técnicas potenciométricas, obteniendo un valor de 8.34. Este valor es consistente con las mencionadas señales de RMN y con la estructura del compuesto, pues se trata de un metileno en β respecto a un grupo cetónico y otro ciano, ambos estabilizantes del intermedio aniónico que forma la base conjugada.

Esta labilidad tiene importantes consecuencias estructurales. El intercambio provoca la racemización del centro estereogénico $5'$, mientras que el carbono espiránico, el número 3, permanece fijo. Así, cada estereoisómero está en equilibrio con su diastereómero correspondiente a la inversión de la configuración del $C5'$ (**esquema 4.2**). En este equilibrio la pareja $(3S, 5'S)-(3R, 5'R)$ está más favorecida, como demuestra el hecho de que la señal a 5.37 ppm integre más que la de 4.97 ppm. Esto es esperable, pues el grupo ciano, más voluminoso que el H, generaría más tensión estérica si se sitúa del mismo lado de la piridona que el anillo aromático del indol.



Esquema 4.2. Intercambio de protones establecido entre las configuraciones estereoméricas de **4.4**.

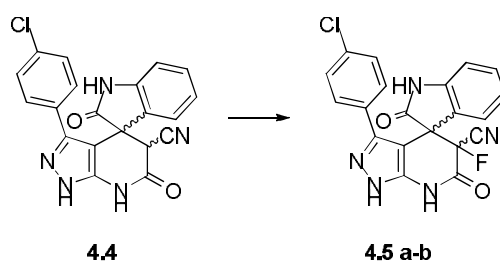
El equilibrio del **esquema 4.2** hace que las parejas diastereoméricas de **4.4** sean muy difíciles de separar por medios físicos. Con medios químicos, sin embargo, se podrían aprovechar las diferentes propiedades reactivas de cada pareja de diastereómeros para derivatizarlos en compuestos separables. Así, bloqueando el equilibrio, las formas $(3S, 5'R)$ y $(3S, 5'S)$, de un lado, y las formas $(3R, 5'R)$ y $(3R, 5'S)$, de otro, dejarían de interconvertirse entre sí y se podrían separar en parejas de diastereómeros. Puesto que en el equilibrio interviene la labilidad del protón del carbono $5'$, si se sustituyera este átomo por un grupo no lábil, el equilibrio se detendría. En base a este análisis, se decidió seleccionar el átomo de flúor como

el sustituyente más apropiado para bloquear el equilibrio sin alterar las propiedades farmacológicas del compuesto al ser bioisómero del hidrógeno.

C. Reacciones de fluoración y evaluación biológica de los diastereómeros.

El método seleccionado para fluorar la posición 5' del anillo de espiro[indol-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina] **4.4** fue usar *Selectfluor*, un reactivo que actúa como una fuente de flúor electrófilo frente a compuestos insaturados o π -excedentes¹⁴⁻¹⁵, como el intermedio aniónico propuesto en el **esquema 4.2**.

Aunque *Selectfluor* solo es totalmente soluble en ciertos disolventes muy polares, como agua, DMF o acetonitrilo, las condiciones experimentales que mejores resultados ofrecieron consisten en el empleo de MeOH, en el que no es totalmente soluble, usando 2 equivalentes y calefacción a reflujo durante 3 h, obteniendo de esta manera la mezcla de diastereómeros **4.5 a-b** (**esquema 4.3**).



Esquema 4.3. Fluoración de **4.4** con *Selectfluor*. Condiciones: *Selectfluor* (2 eq.), MeOH, ref., 3h, 6% para la pareja diastereomérica mayoritaria, 2 % para la pareja diastereomérica minoritaria (rendimientos calculados después de la separación por HPLC).

Actualmente existe controversia acerca de si el mecanismo de acción de *Selectfluor* implica radicales o bien una S_N2 sobre el propio átomo de flúor¹⁵. Ambos mecanismos implican intermedios planos, lo que hace que la reacción no sea estereoselectiva y la proporción diastereomérica de los productos **4.5 a-b** varíe respecto a la de los sustratos **4.4**. Pero ya no se trata de una situación de equilibrio, sino de una mezcla estática porque la tautomería ha quedado bloqueada. Por tanto, estas mezclas ya sí son separables. El análisis por HPLC de **4.5 a-b** tras una prepurificación en columna sobre gel de sílice muestra dos picos cromatográficos, correspondientes a las dos parejas diastereoméricas, en proporción 65:35 a favor de la de menor tiempo de retención (**figura 4.9**).

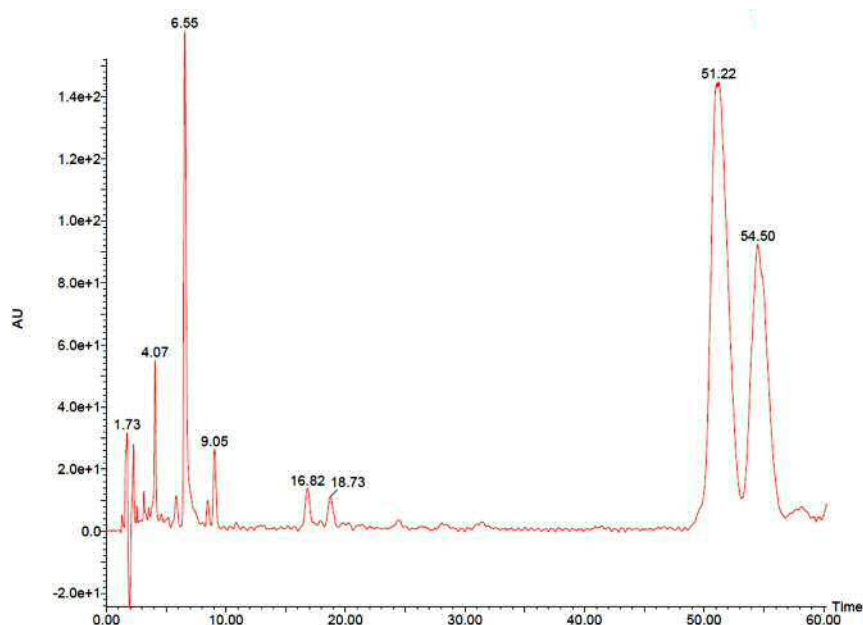
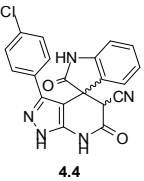
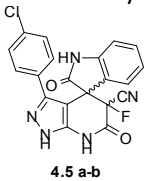


Figura 4.9. Cromatograma del producto de la reacción de **4.5** con *Selectfluor* previamente purificado, donde se aprecian a 51 y 54 minutos los picos de las dos parejas enantioméricas. Condiciones de separación: Columna *SunFire C18*, longitud 150 mm, diámetro 19 mm, tamaño partícula 5 μ , gradiente isocrático agua:acetonitrilo 31%-69%, 0.1% HCOOH, durante 60 min.

Los compuestos **4.5 a-b** se separaron por tanto mediante HPLC semipreparativo en sus dos parejas diastereoméricas con rendimientos globales de 6 % para la de menor tiempo de retención y mayoritaria, **4.5 a**, y del 2 % para la de mayor tiempo de retención y minoritaria, **4.5 b**.

Se evaluó el potencial activador de AMPK *in vitro* de estas parejas en las mismas condiciones que para **4.4**. Los resultados se muestran en la **tabla 4.2**.

Tabla 4.2. Resultados de activación *in vitro* de AMPK con **4.4** y las parejas diastereoméricas de **4.5**

| | |  4.4 | |  4.5 a-b | |
|--------------|-----------|---|-----------------------------|---|--|
| Compuesto | t_R (*) | % activación 30 μ M | % activación 200 μ M | | |
| AMP | - | | | 432 - 440 | |
| A-769662 | - | 724 - 776 | - | | |
| 4.4 | - | 512 | - | | |
| 4.5 a | 38.62 | 342 | - | | |
| 4.5 b | 41.47 | 37 | - | | |

(*) Condiciones de separación: gradiente isocrático agua:acetonitrilo 31:69 %, 0.1 % ácido fórmico, durante 60 minutos.

Los datos de activación de los compuestos fluorados ponen de manifiesto que la incorporación de un átomo de flúor tiene un claro efecto en la actividad enzimática de AMPK. Así **4.5 a** se comporta como activador, con un dato de activación de 342%, mientras que **4.5 b** se comporta como inhibidor.

D. Asignación estructural.

Con el fin de asignar inequívocamente las estructuras de los productos fluorados, así como de establecer la configuración absoluta de las dos parejas de diastereómeros, se efectuó un estudio por RMN que incluyó distintos experimentos de ^1H , ^{13}C y ^{19}F , mono y bidimensionales. La **figura 4.10 (A)** recoge los desplazamientos químicos de ^1H , ^{13}C y ^{19}F de ambas parejas. El espectro de ^{19}F monodimensional mostró que el desplazamiento de F es claramente distinto en cada una de las parejas. En la **figura 4.10 (B)** están representadas las correlaciones clave para la asignación inequívoca obtenidas a partir del análisis de los espectros bidimensionales COSY y HMBC.

Para la asignación de la configuración absoluta se realizó un experimento HOESY (*Heteronuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) que sirve para determinar la proximidad espacial entre dos núcleos diferentes, en nuestro caso ^{19}F - ^1H HOESY. Además, se realizó un experimento INEPT (*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*) de ^{15}N directo, desacoplado de ^1H , para medir la constante de acoplamiento ^{15}N - ^{19}F , con la que asignar el valor del ángulo diedro entre el F y el N en posición 7'. Este experimento mejora mucho la sensibilidad con respecto a un ^{15}N directo, debido a la transferencia de polarización entre el ^1H y el ^{15}N . Sin embargo, la poca disponibilidad de muestra no permitió la asignación definitiva de la configuración de ambas parejas, estando pendientes estudios de cristalografía que puedan ser concluyentes.

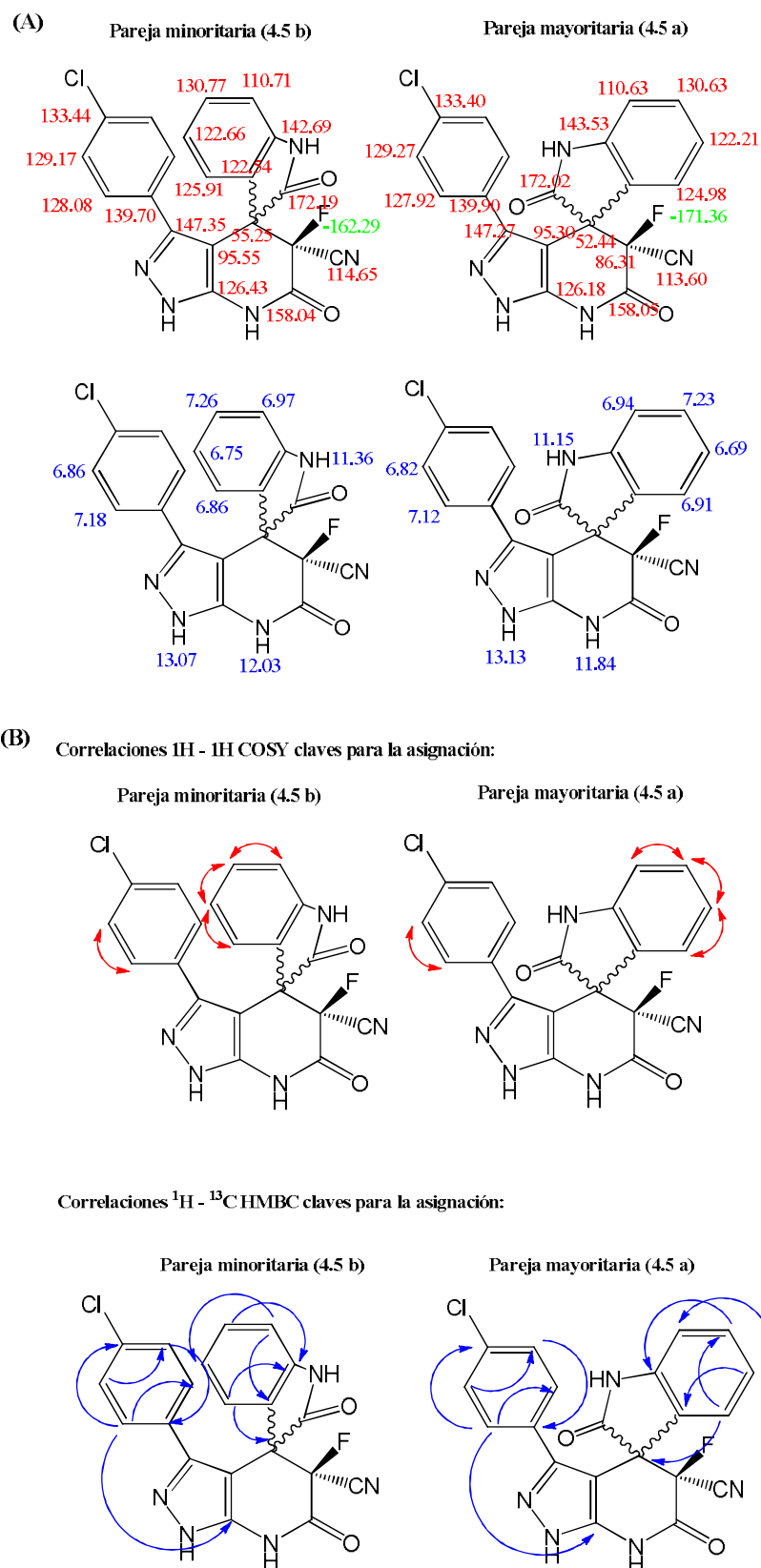
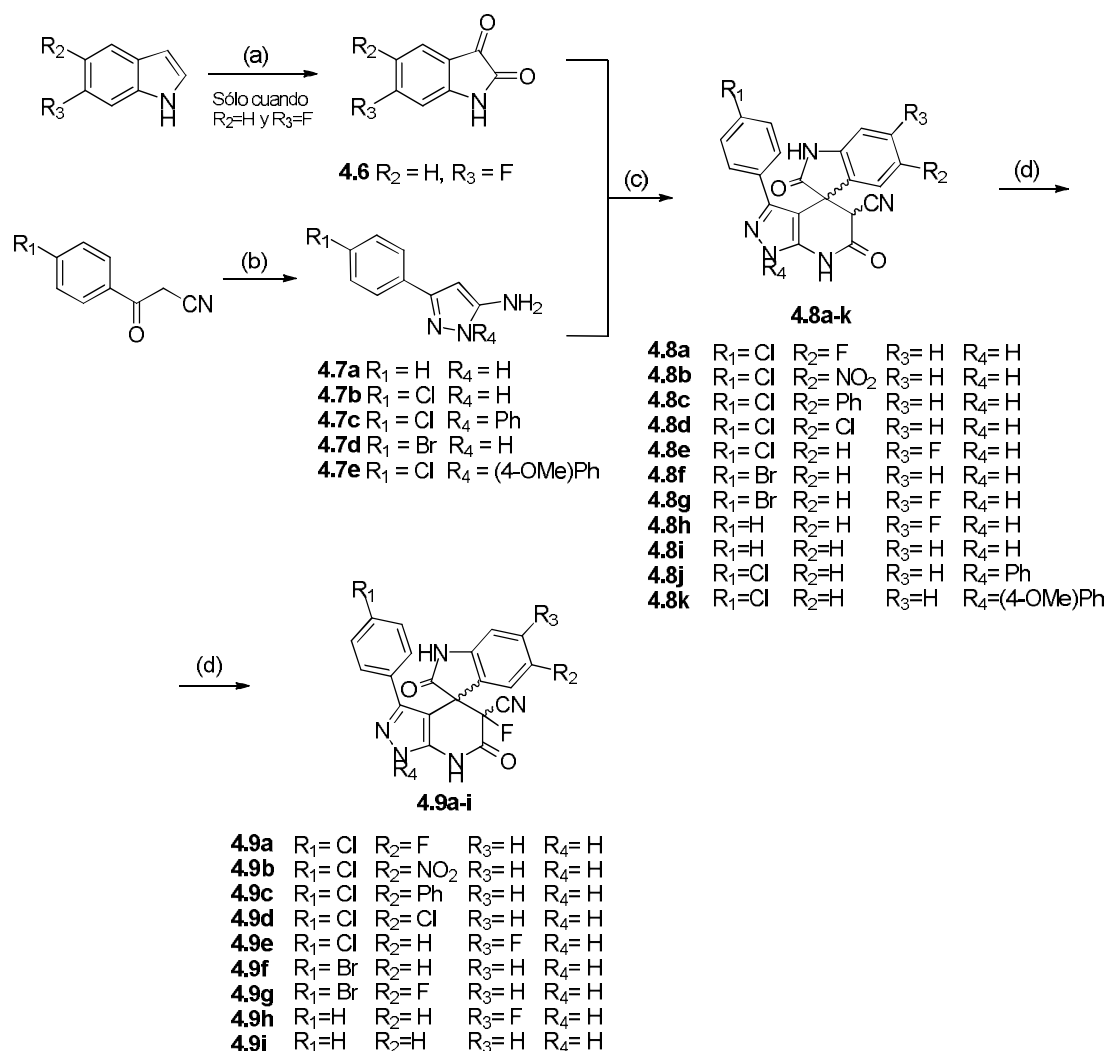


Figura 4.10. (A) Desplazamientos químicos de ^1H , ^{13}C y ^{19}F asignados para cada pareja de diastereómeros de **4.5**. (B) Correlaciones COSY y HMBC claves para la asignación inequívoca de estos desplazamientos.

4.2.2 Optimización de los prototipos derivados de espiro [indolina-pirazol] piridinona

A. Síntesis

Con el objetivo de optimizar la estructura de los prototipos preparados para la modulación de AMPK, nos planteamos ampliar esta serie química. Esta familia se obtuvo mediante la estrategia de síntesis empleada previamente para **4.5 a-b** (esquemas 4.1 y 4.3). Así, se parte en la mayoría de los casos de isatinas disponibles comercialmente. Para explorar la influencia de la sustitución en posición 6 se preparó el compuesto **4.6**, obtenido partiendo del 6-fluorindol y oxidando el doble enlace con PCC a 70 °C durante 5h¹⁶ (esquema 4.5).



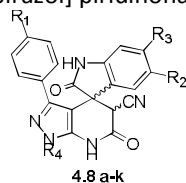
Esquema 4.5. Síntesis de la familia de espiro [indolina-pirazol] piridinona con diferentes sustituyentes. Reactivos y condiciones: (a) R₄-NH-NH₂ (1 eq.), EtOH, ref., 8 h, 81 %; (b) PCC (4 eq.), DCE, 70 °C, 5 h, 40 – 71 %; (c) Cianoacetato de etilo (1 eq.), cat., agua, 90 °C, 8 h, 5 – 76 %; (d) *Selectfluor* (2 eq.), MeOH, ref., 3 h, 1 – 11 %.

En el **esquema 4.5** se recoge la formación de los pirazoles **4.7 a-e**. A partir de los correspondientes benzoilacetnitrilos comerciales con hidrazina, tiene lugar una doble adición nucleófila al carbonilo y al grupo ciano, obteniéndose los intermedios buscados con buenos rendimientos¹⁷⁻¹⁸.

La purificación de los compuestos de la serie **4.8** fue especialmente sencilla en los casos **a, b, c, g y j**, en los que el producto final precipitó en el agua al enfriarse el crudo de reacción, como sucedía con **4.4**. En los demás casos, fue precisa una cromatografía en columna sobre gel de sílice.

Al igual que en el prototipo de esta familia, el compuesto **4.4**, la proporción diastereomérica para los compuestos de la familia **4.8** se midió en base al valor de las integrales de las señales de ¹H del espectro de RMN en torno a 5.0 y 5.5 ppm. La **tabla 4.3** muestra los resultados obtenidos. Se observa que, como en el caso de **4.4**, la señal en torno a 5.0 ppm, fue en todos los casos la mayoritaria, asignable a la pareja en la que el ciano está en el lado contrario al anillo aromático del indol.

Tabla 4.3. Rendimientos y proporción diastereomérica obtenida en la síntesis de las espiro[indolina-pirazol] piridinonas.



| Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | mayoritario:minoritario ^a | ed, % ^a |
|--------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|--------------------------------------|--------------------|
| 4.8 a | Cl | F | H | H | 72:28 | 44 |
| 4.8 b | Cl | NO ₂ | H | H | 81:19 | 62 |
| 4.8 c | Cl | Ph | H | H | 85:15 | 70 |
| 4.8 d | Cl | Cl | H | H | 62:38 | 24 |
| 4.8 e | Cl | H | F | H | 60:40 | 20 |
| 4.8 f | Br | H | H | H | 61:39 | 22 |
| 4.8 g | Br | F | H | H | 76:24 | 52 |
| 4.8 h | H | H | F | H | 72:28 | 44 |
| 4.8 i | H | H | H | H | 66:33 | 33 |
| 4.8 j | Cl | H | H | Ph | 57:43 | 14 |
| 4.8 k | Cl | H | H | (4-OMe)Ph | 78:22 | 56 |

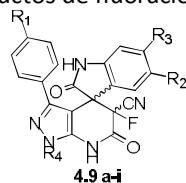
(a) Proporción medida como la razón de las integrales de las señales en los entornos de 5.0 y 5.5 ppm de los espectros de ¹H-RMN.

Las mezclas de diastereómeros **4.8 a-j** se sometieron a condiciones de fluoración tal y como se recoge en el **esquema 4.5**, obteniéndose las correspondientes parejas diastereoméricas de los compuestos fluorados **4.9 a-i**.

La proporción diastereomérica medida usando los picos cromatográficos, se muestra en la **tabla 4.4**. Se observa que ahora no siempre la pareja mayoritaria es la de mayor tiempo de retención. Para los compuestos **4.9 a, c, d, e y g** sí lo es, mientras que para **4.9 b y f** es mayoritaria la de menor tiempo de retención. También se muestran los rendimientos obtenidos para el aislamiento de cada pareja, calculados después de la separación cromatográfica.

Los compuestos **4.8 j y k**, sustituidos en el nitrógeno 1 del pirazol, descomponen en las condiciones de fluoración, mientras que los compuestos **4.8 h e i** originaron mezclas diastereoméricas que no se consiguieron separar con las técnicas cromatográficas disponibles. En el caso de **4.9 h**, el cromatograma mostraba los dos picos solapados, mientras que el **4.9 i** mostraba un único pico simétrico.

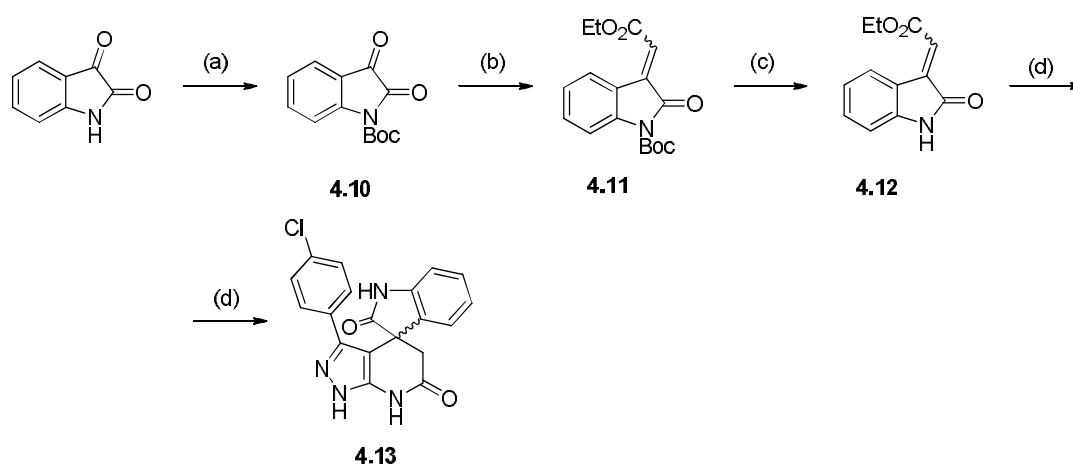
Tabla 4.4. Proporciones y rendimientos obtenidos para cada una de las parejas diastereoméricas de los productos de fluoración **4.9**.



| Producto | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | mayoritario:menoritario ^a | ed, % ^a | r, % (menor t _R , mayor t _R) ^b |
|--------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|--------------------------------------|--------------------|---|
| 4.9 a | Cl | F | H | H | 63:37 | 26 | 7, 3 |
| 4.9 b | Cl | NO ₂ | H | H | 40:60 | 20 | 8, 4 |
| 4.9 c | Cl | Ph | H | H | 75:25 | 50 | 8, 4 |
| 4.9 d | Cl | Cl | H | H | 70:30 | 40 | 6, 4 |
| 4.9 e | Cl | H | F | H | 60:40 | 20 | 11, 6 |
| 4.9 f | Br | H | H | H | 45:55 | 10 | 2, 2 |
| 4.9 g | Br | H | F | H | 55:45 | 10 | 13, 1 |
| 4.9 h | H | H | F | H | No separables | | |
| 4.9 i | H | H | H | H | No separables | | |

(a) Medidas como la relación de áreas de los picos cromatográficos. (b) Medidos después de la separación cromatográfica. Condiciones de separación: Columna *SunFire* C18, longitud 150 mm, diámetro 19 mm, tamaño partícula 5μ. Gradiente de elución indicado en cada caso (ver sección de procedimientos experimentales).

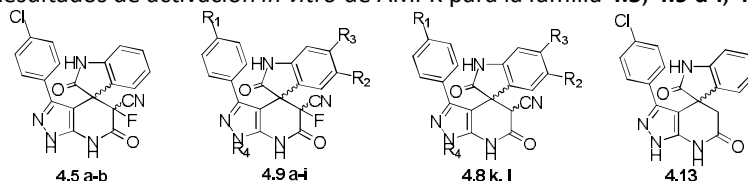
Por otro lado, y con el fin de evaluar la influencia que el grupo ciano en posición 5' tenía en la actividad de esta familia, se llevó a cabo la síntesis del análogo a **4.4** sin el grupo ciano en posición 3. La secuencia se encuentra detallada en el **esquema 4.6**. En primer lugar se lleva a cabo la protección de la isatina con Boc, aislado en el intermedio **4.10** sobre el que se realiza una reacción de Wittig para obtener el intermedio **4.11**¹⁹. La reacción final de espiriociclación transcurre mejor en medio de HAc como codisolvente en una mezcla agua:EtOH:HAc 4:2:1, obteniéndose el compuesto **4.13**.



Esquema 4.6. Síntesis de espiro [indolina-pirazol] piridinona. Reactivos y condiciones: (a) Boc_2O (1 eq.), DMAP (1 %mol), THF anh., t.a., 8 h, 76 %; (b) $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCO}_2\text{Et}$ (1 eq.), CHCl_3 , t.a., 1 h, 60 %; (c) AcOEt saturado con HCl, t.a., 30', 78 %; (d) **4.5 a** (1 eq.), $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}:\text{HAc}$ 4:2:1, ref., 8 h, 18 %.

B. Estudios de activación enzimática frente a AMPK.

La **tabla 4.5** muestra los datos de activación *in vitro* de los nuevos compuestos sintetizados, medidos en las mismas condiciones que los de **4.4** y **4.5**. Se incluyen también **4.8 j** y **k**, puesto que la fluoración provocó la descomposición del sustrato de partida y no se pudo obtener el derivado fluorado correspondiente. Para los compuestos **4.9 h** e **i**, se ensayaron las mezclas diastereoméricas sin separar.

Tabla 4.5. Resultados de activación *in vitro* de AMPK para la familia **4.5**, **4.9 a-i**, **4.8 j y k** y **4.13**


| Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | % activación, 30 μM Pareja de menor t _R | % activación, 30 μM Pareja de mayor t _R | % activación, 200 μM |
|-------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|---|---|-------------------------|
| AMP | - | - | - | - | - | - | 415 |
| A-769662 | - | - | - | - | 674 | - | - |
| 4.5a | Cl | H | H | H | 342 | - | - |
| 4.5b | Cl | H | H | H | 37 | - | - |
| 4.9a | Cl | F | H | H | 41 | 14 | - |
| 4.9b | Cl | NO ₂ | H | H | 39 | 30 | - |
| 4.9c | Cl | Ph | H | H | 50 | 48 | - |
| 4.9d | Cl | Cl | H | H | 33 | 42 | - |
| 4.9e | Cl | H | F | H | 10 | - | - |
| 4.8j | Cl | H | H | Ph | | 108 ^b | - |
| 4.8k | Cl | H | H | (4-OMe)Ph | | 98 ^b | - |
| 4.13 | - | - | - | - | | 29 ^c | - |

(a) Parejas diastereoméricas imposibles de separar con los medios disponibles. (b) Ensayada la pareja de diastereómeros sin separar. (c) Compuesto presente en una única pareja de enantiómeros.

A partir de los datos obtenidos se pueden establecer las primeras conclusiones acerca de los requisitos estructurales para la actividad de estos compuestos. Como se observa en la tabla, todos los compuestos ensayados muestran un porcentaje de activación *in vitro* inferior a **4.5 a**, poniendo de manifiesto unos requisitos estructurales estrictos con respecto a los sustituyentes en las posiciones de los distintos anillos, y por tanto claves en la regulación de la interacción con AMPK. Así, deben ser especialmente relevantes en el motivo de espiro[indolina-pirazol-piridina], la combinación resultante de la ausencia de sustituyentes tanto en el anillo aromático del indol como en el nitrógeno del pirazol, unido a la presencia del resto 4-clorofenilo en el pirazol. Por otro lado, la disposición espacial que proporciona el carbono espiránico al sistema de indol respecto del grupo ciano de la piridona proporciona un entorno químico altamente propicio para establecer interacciones favorables con el enzima.

C. Estudios de activación en células de AMPK.

Para corroborar si los compuestos de esta serie inducen la activación en células de AMPK, se llevó a cabo ensayos de fosforilación de Thr172 en cultivo celular, empleando la línea celular HEK-293. Las células se trataron con los compuestos a varias concentraciones durante 1 hora, utilizando como control positivo del ensayo fenformina a la concentración de 5 mM. Las células son lisadas y analizadas mediante *western blot* usando anti-phosphoThr172 y anti-fosfo-Ser79 ACC.

A la vista de los resultados de actividad enzimática obtenidos, se decidió evaluar el compuesto **4.5 a**, por ser el compuesto más activo de la serie.

El resultado para **4.5 a** se muestra en la **figura 4.11**, comprobándose que existe activación de AMPK de una manera dependiente de la dosis. Este efecto se confirma por el aumento de fosforilación también dependiente de dosis de su sustrato ACC, en un rango de concentraciones comprendido entre 60-120 μM .

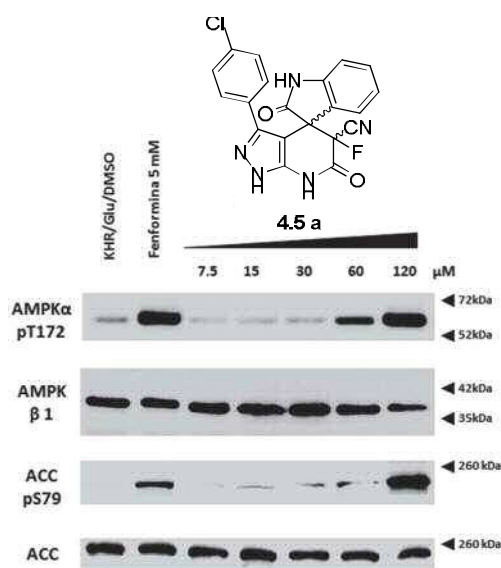


Figura 4.11. Análisis de *Western Blot* que muestra que el compuesto **4.5 a** activa AMPK de una manera dosis dependiente. Este efecto se confirma por el aumento de fosforilación también dependiente de dosis de su sustrato ACC, en un rango de concentraciones comprendido entre 7,5 – 120 μM . Las células Hek293 son tratadas con las concentraciones indicadas de **4.5 a** durante 1 hora. Las células lisadas son analizadas mediante *Western Blot* usando anti-phosphoThr172 AMPK alfa, anti-AMPKβ1 (usado como control de carga), anti-phosphoSer79ACC y anti-ACC (usado como control de carga). Los marcadores moleculares de peso están indicados a la derecha de la figura.

Por otro lado, para comprobar la importancia que algunas de las posiciones podrían tener en la interacción con el enzima y corroborar en parte el SAR establecido, se seleccionaron los compuestos **4.9 e, f, g** para valorar su efecto en la fosforilación de AMPK, a pesar de no tener el dato de actividad *in vitro*.

La **figura 4.12** muestra el mismo ensayo para las parejas de los compuestos **4.9 e**, la mayoritaria de **4.9 f** y la minoritaria **4.9 g**, en este caso con un rango de concentraciones 5 – 100 μM . Los resultados son igualmente positivos, y se mantiene un nivel de activación a simple vista a 100 μM similar al de la fenformina a 5 mM.

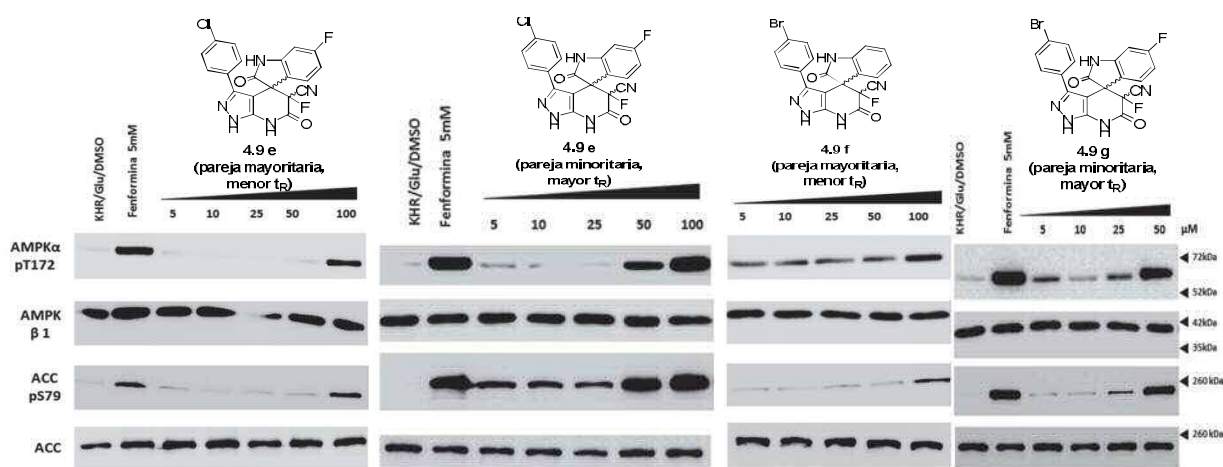


Figura 4.12. Análisis de *Western Blot* que muestra que las parejas de **4.9 e**, la mayoritaria de **4.9 f** y la minoritaria de **4.9 g** activan AMPK de una manera dosis dependiente. Las células Hek293 son tratadas con las concentraciones indicadas de los compuestos durante 1 hora. Las células lisadas son analizadas mediante *Western Blot* usando anti-phosphoThr172 AMPK alfa, anti-AMPK β 1 (usado como control de carga), anti-phosphoSer79ACC y anti-ACC (usado como control de carga). Los marcadores moleculares de peso están indicados a la derecha de la figura.

Los ensayos de fosforilación en células realizados ponen de manifiesto la importancia del átomo de bromo, como sustituyente del anillo de pirazol. Ya que como se puede apreciar en los *western blot*, correspondientes al compuesto **4.5a** frente a su análogo **4.9f**, se consigue un claro aumento de la fosforilación en células, llegando a observarse el efecto a concentraciones 5 μM , lo que significa una dosis diez veces inferior a la observada en el prototipo inicial, donde el efecto es claro a concentraciones de 60 μM .

A falta de comprobar el efecto en el enzima aislado, este hecho representa un resultado muy prometedor de cara a la validación de esta nueva familia como potentes activadores de AMPK.

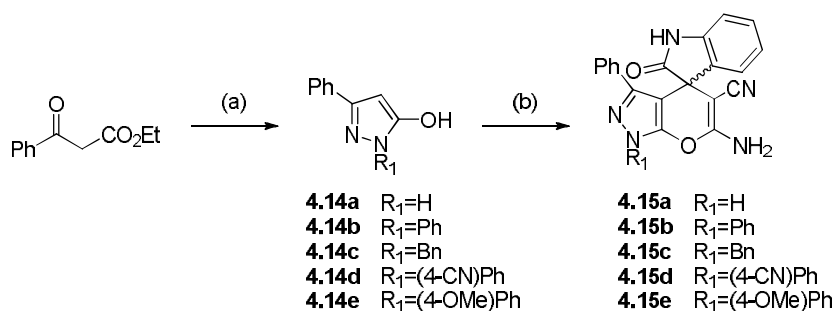
4.2.3 Síntesis y evaluación biológica de derivados modificados de espiro-indolina

Como se comentó en la introducción al capítulo, además de los ciclos de indolin-pirazol-piridona, el espacio químico alrededor de esta nueva familia ha sido explorado con la síntesis de nuevos espirociclos que permitieran enriquecer el estudio de las relaciones estructura-actividad para estos compuestos. Así, se sintetizaron las estructuras de la **figura 4.2**, que contiene tanto sistemas fusionados del tipo indolina-pirazol-piridina e indolina-pirano-pirazol y sistemas sencillos del tipo indolina-piperidina y piperidona.

A. Espiro indolina-pirano-pirazoles

La obtención de esta familia se lleva a cabo sustituyendo el cianoacetato por malononitrilo, que mantiene las propiedades tanto de nucleofilia como de electrofilia para llevar a cabo una espirociclación. El ciclo resultante sería una 6'-aminopiridina 5', 6'-insaturada. Si, además, se sustituye el 5-aminopirazol por un 5-hidroxipirazol, el producto final es un espiro[indolina-pirano-pirazol] 5',6'-insaturado.

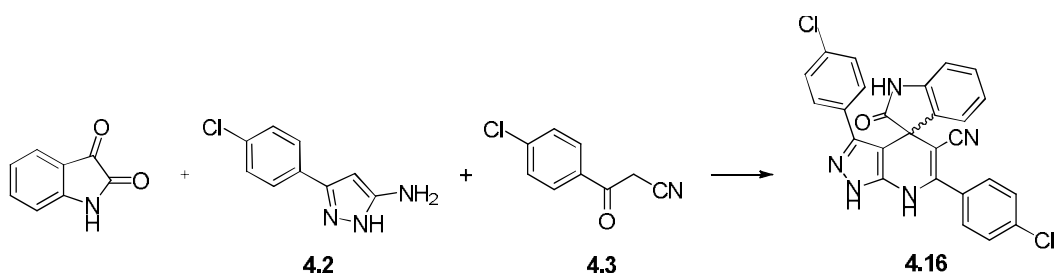
Este procedimiento está reportado en la bibliografía mediante el uso de nitrilos en reacciones multicomponente en las que el hidroxipirazol se forma *in situ*⁹⁻¹⁰. En nuestro caso, las reacciones multicomponente dieron peores resultados que la síntesis aislando el intermedio de 5-hidroxipirazol que se recoge en el **esquema 4.7**. Los hidroxipirazoles **4.14 a-e** se sintetizan fácilmente con una doble adición de hidrazinas sobre compuestos β -dicarbonílicos en medio ácido²⁰⁻²³. En el siguiente paso, los hidroxipirazoles se hicieron reaccionar con el malononitrilo y la isatina para sintetizar la familia **4.15 a-e**, análogos a los compuestos **4.8** pero con un anillo de pirano en lugar de piridona.



Esquema 4.7. Síntesis de la familia de espiro indolina-pirano[2,3-c]pirazoles **4.15 a-e**. Reactivos y condiciones: (a) R₁-NH-NH₂ (1 eq.), HAc, ref., 8 h, 18 – 99 %; (b) Isatina (1 eq.), malononitrilo (1 eq.), piperidina (20 %mol), EtOH, t.a. 8 h, 10 – 91 %.

B. Espiro indolina-pirazol-piridina

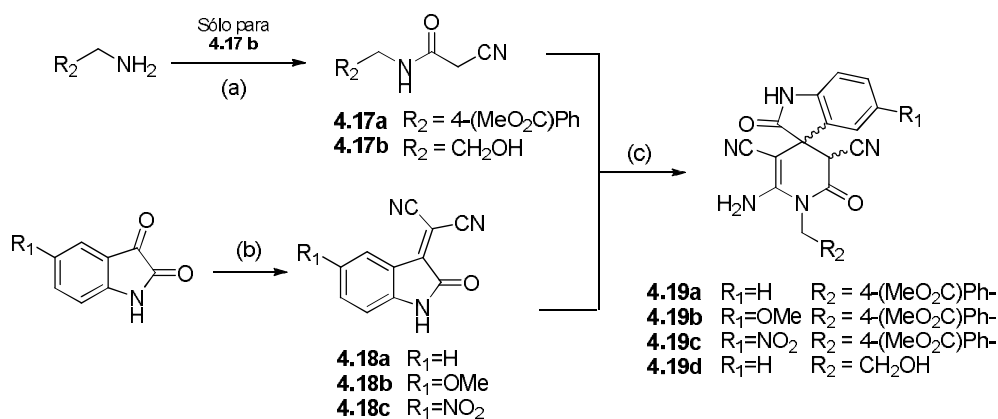
El **esquema 4.8** describe el uso de benzoilacetnitrilos en lugar de cianoacetato de etilo, lo cual genera ciclos de espiro[indolina-pirazol[3,4-*b*]piridina] 5',6'-insaturados, en los que el sustituyente aromático del acetnitrilo queda como sustituyente del C 6'⁷⁻⁸. En base a estos procedimientos, se consiguió llevar a cabo la síntesis del compuesto **4.16** (**esquema 4.8**), mediante una espirociclación con catálisis ácida de HAc al 10 %mol en agua a reflujo durante 8h.



Esquema 4.8. Síntesis del derivado de espiro indolina-pirazol-piridina. Reactivos y condiciones: HAc (10 %mol), agua, ref., 8h, 50 %.

C. Espiro[indolina-piridinas] y espiro[indol-pirazol-piridinas]

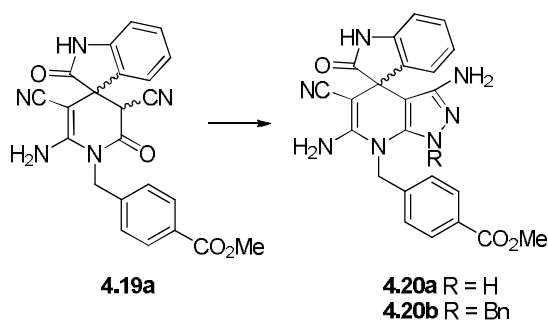
En el **esquema 4.9** se muestra que para la síntesis de estos compuestos es necesario hacer reaccionar el aducto de condensación isatina-malononitrilo con una acetamida⁶, en nuestro caso 2-ciano-*N*-(4-metoxifenil)acetamida, **4.17**, que se prepara a través de un acoplamiento con DCC. Aunque esta síntesis está reportada como multicomponente⁶, se obtuvieron mejores resultados aislando los intermedios de condensación isatina-malononitrilo **4.18 a-c**. El paso final de ciclocondensación se llevó a cabo con catálisis básica de piperidina en EtOH⁶.



Esquema 4.9. Síntesis de la familia de espiro[indolina-piridina]. Reactivos y condiciones: (a) Ácido cianoacético (0.9 eq.), DCC (1 eq.), THF anh., t.a., 8 h, 72 %; (b) Malononitrilo (1 eq.), piperidina (1 eq.), EtOH, 90 °C, 10 min., 41 - 68 %; (c) Para **4.19 a-c**: piperidina (20 – 40 %mol), EtOH, ref., 8 h, 6 - 64 %; Para **4.19d**: piperidina (40 %mol), EtOH, t.a., 8 h, 4 %.

Los compuestos finales **4.19 a-d** así preparados se ensayaron como mezclas diastereoméricas, sin separación cromatográfica previa.

Sobre las estructuras tipo **4.19 a y b** se puede plantear el anclaje de un anillo de pirazol, ya que contienen una agrupación β -cetonitrilo similar a la de los benzilacetoneitrilos con los que se preparan los pirazoles **4.7**. La adición tanto de hidrazina como de benzilhidrazina a **4.19 a** originó las espiro[indol-pirazol-piridinas] **4.20 a - b** con buenos rendimientos (**esquema 4.10**).

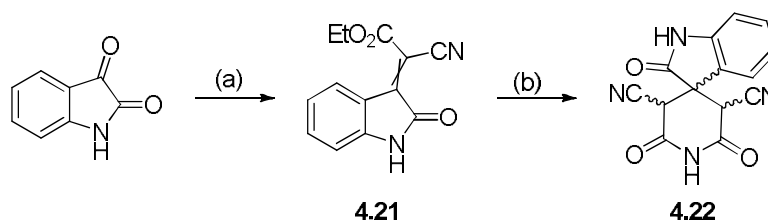


Esquema 4.10. Acoplamiento de un anillo de pirazol al núcleo de espiro [indolina-piridina]. Reactivos y condiciones: Para **4.20a**: Hidrato de hidrazina (16 eq.), ref., 2 h, 67 %; Para **4.20b**: Benzilhidrazina (16 eq.), EtOH, t.a., 8 h, 60%.

D. Espiro indolina-piperidina

Los β -cianoacetatos pueden originar reacciones de espirociclación también con acetamidas para formar el ciclo simétrico, 2,2',6'-trioxospiro[indolina-3,4'-piperidina]-3',5'-dicarbonitrilos

4.22. La síntesis se pudo llevar a cabo la síntesis aislando el aducto de adición del cianoacetato de etilo y la isatina, **4.21**, y posterior reacción con la cianoacetamida en medio básico fuerte de EtONa/EtOH⁵ (**esquema 4.11**).

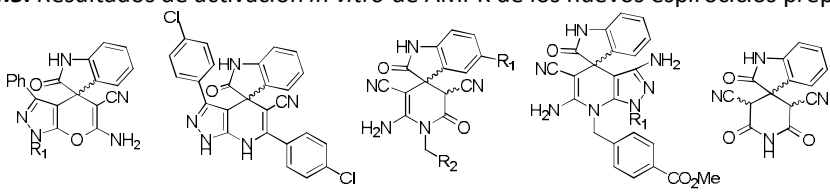


Esquema 4.11. Síntesis del derivado de espiro indolina-piperidina **4.22**. Reactivos y condiciones: (a) Cianoacetato de etilo (1 eq.), piperidina (20 %mol), EtOH, 90 °C, 10 min., 71 %. (b) Cianoacetamida (1 eq.), EtONa/EtOH 21 % en peso (1 eq.), t.a., 5 h, 44 %.

El compuesto **4.22** así preparado se ensayó también como mezcla diastereomérica, sin separación cromatográfica previa.

E. Evaluación biológica y estudios de relación estructura-actividad

La **tabla 4.5** muestra los resultados del ensayo de activación *in vitro* de AMPK para todos los espirociclos sintetizados en este sub-apartado.

Tabla 4.5. Resultados de activación *in vitro* de AMPK de los nuevos espirociclos preparados.


| Compuesto | R ₁ | R ₂ | % activación, 30 μ M | % activación, 200 μ M |
|-----------|-----------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| AMP | - | - | - | 415 |
| A-769662 | - | - | 674 | - |
| 4.15 a | H | - | 101 | - |
| 4.15 b | Ph | - | 74 | - |
| 4.15 c | Bn | - | 105 | - |
| 4.15 d | (4-CN)Ph | - | 117 | - |
| 4.15 e | (4-OMe)Ph | - | 125 | - |
| 4.16 | - | - | 108 | - |
| 4.19 a | H | 4-(MeO ₂ C)Ph- | 69 | - |
| 4.19 b | OMe | 4-(MeO ₂ C)Ph- | 84 | - |
| 4.19 c | NO ₂ | 4-(MeO ₂ C)Ph- | 83 | - |
| 4.19 d | H | CH ₂ OH | 80 | - |
| 4.20 a | H | - | 46 | - |
| 4.20 b | Bn | - | 58 | - |
| 4.21 | - | - | 73 | - |

Los datos de activación obtenidos indican que, de las distintas familias preparadas, tan solo la familia de indolina-pirano[2,3-c]pirazoles, (**4.15 a-e**) es la que presenta un perfil de activador discreto con porcentajes de activación que oscilan entre 125%-101%.

Comparando los requisitos estructurales para la actividad de los representantes de la familia de indolina-pirazol-piridina, **4.5a**, con los derivados de indolina-pirano-pirazol (**4.15**), podrían estar sugiriendo dos modos de interacción diferentes con el enzima.

4.3 Estudio de fosforilación en células endoteliales

A la vista de los interesantes resultados de los ensayos de fosforilación, y de que es el compuesto mejor caracterizado en cuanto a activación *in vitro* y en células, se decidió abrir una línea paralela de caracterización biológica para **4.5a**, explotando otra de las implicaciones

fisiológicas de AMPK: las vasculares. Como se comentó en el capítulo introductorio, AMPK endotelial está involucrada en diversas alteraciones vasculares que pueden afectar a distintos niveles²⁴. Desde las complicaciones circulatorias de la obesidad a través de la bicapa lipídica interna de los vasos sanguíneos y la presión arterial²⁵⁻²⁶, hasta la neuroprotección²⁷ o la recuperación post-infarto²⁸.

Las células endoteliales (BAE, *Bovine Aorta Endothelium*) se incubaron durante 15 min con el **compuesto 4.5a** a diferentes concentraciones (5, 10, 25, 50 y 100 μ M), utilizando AICAR (1mM) como control positivo. Los resultados se muestran en la **figura 4.13**.

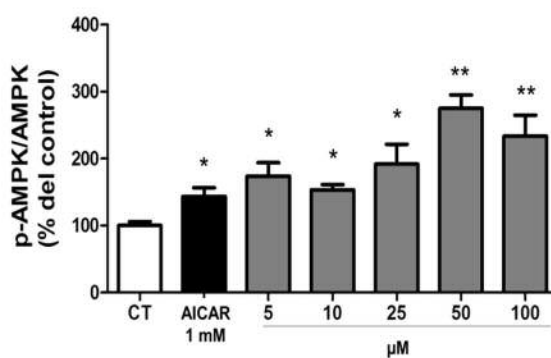


Figura 4.13. Efecto del compuesto **4.5 a** sobre la expresión de AMPK y p-AMPK en células endoteliales de aorta de bovino (BAEs) expresado como porcentaje de pAMPK α /AMPK α frente al grupo control (CT). Como control positivo se utilizó AICAR 1 mM.

En la **figura 4.13** se observa que **4.5a** produjo un incremento significativo de AMPK fosforilada a todas las concentraciones ensayadas, todas de un orden de magnitud inferior que AICAR.

Estos resultados suponen un punto de partida interesante para estudiar el potencial que **4.5a**, como cabeza de serie, y en general los compuestos preparados, pueden desplegar en la modulación de AMPK endotelial, así como las implicaciones terapéuticas de esta modulación.

4.4 Conclusiones.

En este capítulo se han descubierto nuevas familias de activadores *in vitro* de AMPK sirviéndonos de la versatilidad química de las isatinas. De manera que hemos podido comprobar cómo las reacciones de espirociclación nos han servido para originar estructuras privilegiadas en la activación de esta proteína de una forma rápida y sencilla.

La quimioteca de espirocompuestos preparada ha permitido un estudio de la relación estructura-actividad de este espacio químico que pone de relieve conclusiones importantes en el campo de la modulación de la actividad de AMPK. Las diferentes sustituciones hechas en los anillos aromáticos, así como la síntesis de nuevos ciclos aportan una valiosa información en lo referente a la naturaleza de los grupos y sustituyentes de esta nueva familia, así como la importancia de su estructura tridimensional. Entre los compuestos preparados, el más activo *in vitro* es el cabeza de serie, **4.5 a**, perteneciente a la primera familia de ciclos sintetizada, las espiro [indolina-pirazol] piridinona. Por otro lado, los compuestos con un átomo de bromo en el anillo del indol de esta misma familia, **4.9 f** y **g**, muestran mejor capacidad de fosforilación de AMPK en células que el cabeza de serie **4.5 a**.

AMPK endotelial es otra de las dianas sobre las que el prototipo **4.5 a** muestra una actividad interesante, abriendo una nueva línea de investigación a desarrollar.

En definitiva, a la vista de los resultados de este capítulo y del objetivo global del trabajo, estas familias de compuestos arrojan nueva luz acerca de los mecanismos de modulación y de su relación con la estructura de una proteína que actualmente centra un interés considerable en la investigación químico-médica, pues puede suponer un nuevo abordaje farmacológico para el tratamiento de enfermedades de gran extensión y vigencia.

4.5 Procedimientos experimentales.

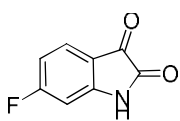
4.5.1 Métodos generales

Todos los análisis por TLC, HPLC-MS y HPLC analíticos, punto de fusión y análisis elementales y las purificaciones por cromatografía en columna *Flash* se realizaron siguiendo los procedimientos indicados en el capítulo 2.

Las separaciones de las parejas de diastereómeros por HPLC semipreparativo se realizaron en las siguientes condiciones generales: columna *SunFire* C18 de 150 mm de longitud, 19 mm de diámetro y 5 μ de tamaño de partícula. El gradiente de elución se detalla en cada caso.

4.5.2 Procedimientos de síntesis

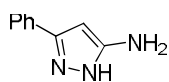
6-fluoroisatina²⁹ (4.6)



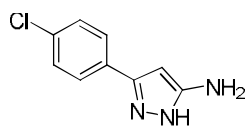
A una disolución de 6-fluoroindol (500 mg, 3.70 mmol) en 20 mL de DCE se añade una disolución de PCC (3.19 g, 14.80 mmol) gota a gota a t.a. La mezcla se agita a 70 °C durante unas 5h. Una vez terminada la reacción, el crudo se filtra se lava con AcOEt. Se elimina el disolvente de las aguas de filtrado a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 1:1), obteniéndose 375 mg (81 %) de un sólido marrón. **P.f.** 220 – 222 °C (bibl. 197 – 199 °C). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.02 (s, 1H, NH), 7.77 – 7.65 (m, 1H, H7), 6.85 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H4), 6.69 (d, J = 6.0 Hz, 1H, H5). **HPLC:** t_R = 4.47 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 166.8 [M+H]⁺.

Procedimiento general de síntesis de 5-amino-3-fenil-1H-pirazoles

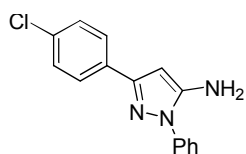
A una disolución del correspondiente benzoilacetonitrilo (100 mg, 1 eq.) en 10 mL de EtOH a reflujo se añade la correspondiente hidrazina (1.5 eq.). La mezcla se deja agitar a reflujo una noche. Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo seco se tritura en Et₂O, apareciendo un precipitado que se filtra y se lava con Et₂O frío y se deja secar al aire.

3-amino-5-fenil-1H-pirazol³⁰ (4.7 a)

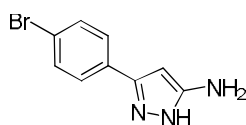
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5-amino-3-fenil-1H-pirazoles, se obtienen 69 mg (64 %) de un sólido blanco. **P.f.** 135 °C (bibl. 120 – 125 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.65 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H2'), 7.37 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H3'), 7.27 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H4'), 5.76 (s, 1H, H4), 4.76 (s, 2H, NH₂). **HPLC**: *t_R* = 2.69 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 160.2 [M+H]⁺.

3-amino-5-(4-clorofenil)-1H-pirazol³¹ (4.7 b)

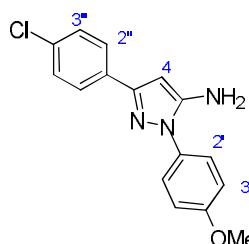
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5-amino-3-fenil-1H-pirazoles, se obtienen 150 mg (66 %) de un sólido blanco. **P.f.** 169 °C (bibl. 170 – 175 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H2'), 7.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H3'), 5.73 (s, 1H, H4), 4.90 (s, 2H, NH₂). **HPLC** (H₂O 15 → 95 % MeCN, 0.2% HCOOH durante 10 min): *t_R* = 4.49 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 194.0 [M+H]⁺.

3-amino-5-(4-clorofenil)-2-fenil-1H-pirazol³² (4.7 c)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5-amino-3-fenil-1H-pirazoles, se obtienen 60 mg (40 %) de un sólido blanco. **P.f.** 190 – 192 °C (bibl. 186 – 187 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.76 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H2'), 7.64 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H3'), 7.55 – 7.29 (m, 5H, Ph), 5.92 (s, 1H, H4), 5.48 (s, 2H, NH₂). **HPLC**: *t_R* = 5.05 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 269.9 [M]⁺.

3-amino-5-(4-bromofenil)-1H-pirazol³¹ (4.7 d)

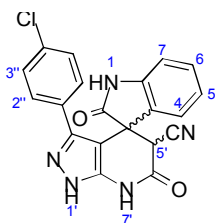
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5-amino-3-fenil-1H-pirazoles, se obtienen 74 mg (71 %) de un sólido blanco. **P.f.** 160 – 162 °C (bibl. 173 – 175 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.72 (s, 1H, NH), 7.55 (m, 4H, H-Ar), 5.73 (s, 1H, H4), 4.89 (s, 2H, NH₂). **HPLC**: *t_R* = 2.98 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 239.8 [M]⁺.

3-amino-5-(4-clorofenil)-1-(4-metoxifenil)-1H-pirazol (4.7 e)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5-amino-3-fenil-1H-pirazoles, se obtienen 69 mg (42 %) de un sólido marrón. **P.f.** > 300 °C **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H2''), 7.52 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H2'), 7.43 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H3''), 7.06 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H3'), 5.89 (s, 1H, H4), 5.35 (s, 2H, NH₂), 3.81 (s, 3H, CH₃). **HPLC**: *t*_R = 4.93 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 299.9 [M]⁺.

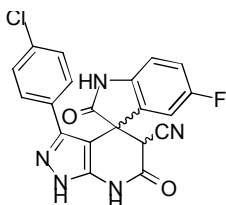
Procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos

Se disuelven la correspondiente isatina (1 eq.) en agua (0.05 mL/mg) y a la mezcla se añade cianoacetato de etilo (1 eq.) y el catalizador indicado en cada caso, agitándose a 80 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se añade el correspondiente 3-amino-5-fenil-pirazol (1 eq.), y se agita una noche a 90 °C. Una vez finalizada la reacción, el crudo se purifica según el procedimiento indicado en cada caso.

3'-(4-clorofenil)-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina]-5'-carbonitrilo (4.4)

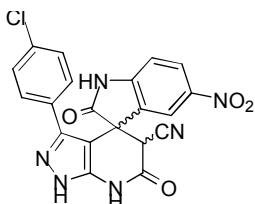
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 340 mg (2.311 mmol) de isatina. Se usa trietilamina (10 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, el crudo se deja enfriar a t.a., apareciendo un precipitado marrón que se filtra y lava con agua y Et₂O, obteniéndose 666 mg (75 %) de un sólido marrón. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.92 (s, 1H minor., NH), 12.79 (s, 1H, NH), 11.44 (s, 1H minor., NH), 11.19 (s, 1H, NH), 11.02 (s, 1H minor., NH), 10.95 (s, 1H, NH), 7.44 – 7.28 (m, 1H), 7.17 – 6.76 (m, 8H, H-Ar), 6.73 – 6.61 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.38 – 5.25 (s, 1H, H5'), 4.96 – 4.89 (s, 1H minor., H5'). **HPLC** (H₂O 15 → 95 % MeCN, 0.2% HCOOH durante 10 min): *t*_R = 7.44 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 390.2 [M+H⁺].

3'-(4-clorofenil)-5-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.8 a)



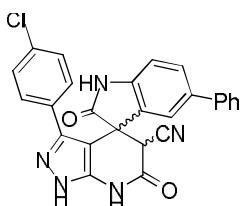
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilos, se partió de 200 mg (1.211 mmol) de 5-fluoroisatina. Se usa HAc (40 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, el crudo se deja enfriar a t.a. Se filtra el precipitado resultante, se lava con agua y se deja secar, obteniéndose 290 mg (58 %) de un sólido marrón. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12.97 (s, 1H minor.), 12.84 (s, 1H), 11.45 (s, 1H minor.), 11.25 (s, 1H), 11.06 (s, 1H minor.), 11.00 (s, 1H), 7.68 – 6.85 (m, 9H, H-Ar), 5.38 (s, 1H, H5'), 4.97 (s, 1H minor., H5') **HPLC**: *t_R* = 3.80 (95 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 408.2 [M+H⁺].

3'-(4-clorofenil)-5-nitro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.8 b)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilos, se partió de 200 mg (1.041 mmol) de 5-nitroisatina. Se usa trietilamina (40 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, se elimina parte del disolvente a presión reducida hasta dejar un volumen aproximadamente igual a la mitad del inicial. Al enfriar a t.a., se observa la aparición de un precipitado que se filtra y lava con agua y DCM, obteniéndose 140 mg (31 %) de un sólido rojo. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 13.05 (s, 1H minor.), 12.91 (s, 1H), 11.76 (s, 1H minor.), 11.67 (s, 1H), 11.60 (s, 1H minor.), 11.33 (s, 1H), 8.34 – 6.81 (m, 9H), 5.62 (s, 1H, H5'), 5.11 (s, 1H minor., H5'). **HPLC**: *t_R* = 3.80 (97%). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 435.2 [M+H⁺].

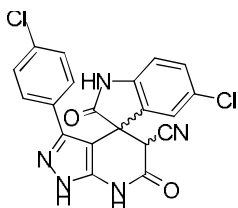
3'-(4-clorofenil)-2,6'-dioxo-5-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.8 c)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilos, se partió de 35 mg (0.157 mmol) de 5-fenilisatina. Se usa HAc (10 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, se elimina parte del disolvente a presión reducida hasta dejar un volumen aproximadamente igual a la mitad del inicial. Se deja enfriar a t.a. El sólido resultante se filtra y se lava con agua y DCM, obteniéndose 21 mg (25 %) de un sólido blanco. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ

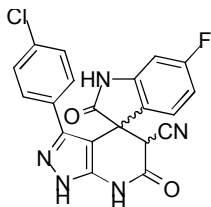
(ppm): 12.96 (s, 1H minor.), 12.83 (s, 1H), 11.45 (s, 1H minor.) 11.23 (s, 1H), 11.03 (s, 1H), 7.36 – 6.86 (m, 14H, H-Ar), 5.40 (s, 1H, H5'), 4.96 (s, 1H minor., H5'). **HPLC**: t_R = 4.36 (96%). **EM** (ES, modo positivo): m/z 466.1 $[M+H]^+$.

5-cloro-3'-(4-clorofenil)-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.8 d)



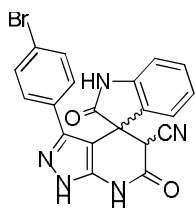
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilos, se partió de 200 mg (1.101 mmol) de 5-cloroisatina. Se usa HAc (40 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 1:1), obteniéndose 80 mg (17 %) de un sólido blanco. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.36 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 10.10 (s, 1H minor.), 9.99 (s, 1H), 7.59 – 6.98 (m, 14H, H-Ar), 5.00 (s, 1H, H5'), 4.73 (s, 1H minor., H5'). **HPLC**: t_R = 3.98 (98%). **EM** (ES, modo positivo): m/z 424.1 $[M]^+$.

3'-(4-clorofenil)-6-fluor-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.8 e)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilos, se partió de 90 mg (0.545 mmol) de 6-fluoroisatina. Se usa piperidina (10 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, el crudo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 1:2), obteniéndose 50 mg (36 %) de un sólido blanco. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.95 (s, 1H minor.), 12.83 (s, 1H), 11.47 (s, 1H minor.), 11.23 (s, 1H), 11.20 (s, 1H minor.), 11.13 (s, 1H), 7.45 – 6.48 (m, 14H, H-Ar), 5.39 (s, 1H, H5'), 4.95 (s, 1H minor., H5'). **HPLC**: t_R = 3.86 (98%). **EM** (ES, modo positivo): m/z 408.0 $[M+H]^+$.

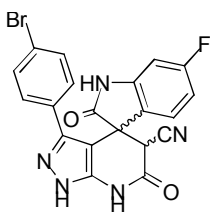
3'-(4-bromofenil)-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.8 f)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilos, se partió de 200 mg (1.359 mmol) de isatina. Se usa piperidina (10 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, el crudo se purifica mediante

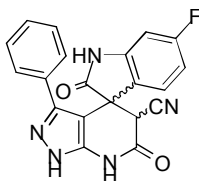
cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 1:2), obteniéndose 336 mg (57 %) de un sólido beige. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.95 (s, 1H minor.), 12.81 (s, 1H), 11.20 (s, 1H minor.), 11.04 (s, 1H), 10.95 (s, 1H minor.), 10.44 (s, 1H), 7.55 – 6.75 (m, 10H, H-Ar), 6.50 – 6.46 (t, *J* = 7.29 Hz, 4H), 5.34 (s, 1H, H5'), 4.92 (s, 1H minor., H5'). **HPLC** (H₂O 15 → 95 % MeCN, 0.2% HCOOH durante 10 min): *t_R* = 7.44 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 434.1 [M+H⁺].

3'-(4-bromofenil)-6-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.8 g)



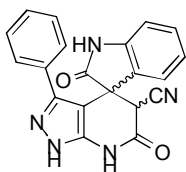
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 100 mg (0.606 mmol) de 6-fluoroisatina. Se usa HAc (40 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, el crudo se deja enfriar a t.a. Se filtra el precipitado marrón resultante, se lava con agua y se deja secar, obteniéndose 158 mg (58 %) de un sólido marrón. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.97 (s, 1H minor.), 12.84 (s, 1H), 11.45 (s, 1H minor.), 11.25 (s, 1H), 11.06 (s, 1H minor.), 11.00 (s, 1H), 7.68 – 6.85 (m, 9H), 5.38 (s, 1H, H5'), 4.97 (s, 1H minor., H5'). **HPLC**: *t_R* = 3.92 (98%). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 454.1 [M+2H⁺].

3'-fenil-6-fluor-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.8 h)



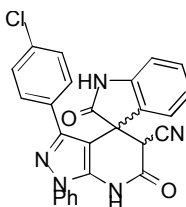
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 100 mg (0.606 mmol) de 6-fluoroisatina. Se usa trietilamina (10 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, el crudo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 1:2), obteniéndose 50 mg (21 %) de un sólido beige. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.95 (s, 1H minor.), 12.83 (s, 1H), 11.47 (s, 1H minor.), 11.23 (s, 1H), 11.20 (s, 1H minor.), 11.13 (s, 1H), 7.48 – 6.32 (m, 16H, H-Ar), 5.39 (s, 1H, H5'), 4.95 (s, 1H minor., H5'). **HPLC**: *t_R* = 3.63 (97 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 474.1 [M+H⁺].

3'-fenil-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo¹ (4.8 i)



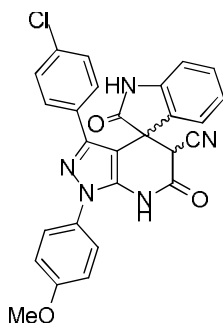
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 100 mg (0.680 mmol) de isatina. Se usa piperidina (10 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, el disolvente se elimina a presión reducida y el crudo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 2:1), obteniéndose 180 mg (76 %) de un sólido beige. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.92 (s, 1H minor., NH), 12.79 (s, 1H, NH), 11.44 (s, 1H minor., NH), 11.19 (s, 1H, NH), 11.02 (s, 1H minor., NH), 10.95 (s, 1H, NH), 7.44 – 7.28 (m, 1H), 7.17 – 6.76 (m, 8H, H-Ar), 6.73 – 6.61 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.31 (s, 1H, H5'), 4.93 (s, 1H minor., H5'). **HPLC** (H₂O 15 → 95 % MeCN, 0.2% HCOOH durante 10 min): *t_R* = 7.44 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 356.1 [M+H⁺]. **Análisis elemental:** Calc. para C₂₀H₁₃N₅O₂: C 67.60, H 3.69, N 19.71. Medido: C 67.49, H 3.98, N 20.02.

3'-(4-clorofenil)-2,6'-dioxo-1'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.8 j)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 55 mg (0.374 mmol) de isatina. Se usa HAc (10 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, el disolvente se elimina a presión reducida hasta dejar aproximadamente la mitad del volumen inicial de reacción. Se filtra, y el sólido resultante se lava con DCM, obteniéndose 90 mg (52 %) de un sólido blanco. **P.f.** 270 – 272 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.72 (s, 1H minor., NH), 11.57 (s, 1H minor., NH), 11.10 (s, 1H, NH), 11.07 (s, 1H, NH), 7.72 – 7.55 (m, 9H), 7.54 – 7.32 (m, 2H), 7.23 – 7.03 (m, 7H), 7.03 – 6.87 (m, 7H), 6.73 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.52 (s, 1H, H5'), 5.17 (s, 1H minor., H5'). **HPLC:** *t_R* = 4.73 (99 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 466.1 [M+H⁺].

3'-(4-clorofenil)-1'-(4-metoxifenil)-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidroespiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.8 k)



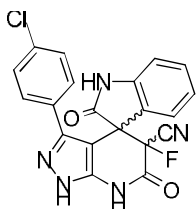
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidroespiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 50 mg (0.400 mmol) de isatina. Se usa HAc (40 %mol) como catalizador. Una vez finalizada la reacción, el disolvente se elimina a presión reducida hasta dejar aproximadamente la mitad del volumen inicial de reacción. Se filtra el precipitado resultante, se lava con DCM y se deja secar, obteniéndose 9 mg (5 %) de un sólido blanco. **P.f.** > 350 °C.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.64 – 7.34 (m, 8H, H-Ar), 7.31 – 7.21 (m, 4H, H-Ar), 7.20 – 7.16 (m, 4H, H-Ar), 5.40 (s, 1H, H5'), 5.00 (s, 1H minor., H5'), 3.80 (s, 5H, OMe).. **HPLC**: *t_R* = 2.25 (97 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 496.6 [M+H⁺].

Procedimiento general de síntesis de 5'-fluoro-2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidroespiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina}-5'-carbonitrilos

Se disuelven el 5'-fluoro-2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidroespiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina}-5'-carbonitrilo correspondiente (1 eq.) y *Selectfluor* (2 eq.) en MeOH y se agita a reflujo durante unas 3 h. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se filtra sobre gel de sílice (DCM:MeOH 10:1) para eliminar los restos inorgánicos y el producto final se separa en sus parejas diastereoméricas mediante HPLC semipreparativo (ver métodos generales) usando el gradiente de elución indicado en cada caso.

3'-(4-clorofenil)-5'-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidroespiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.5 a-b)

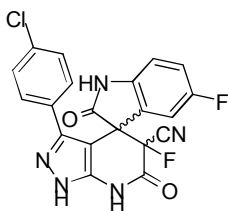


Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5'-fluoro-2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidroespiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 200 mg (0.513 mmol) de **4.4** y se obtuvieron 60 mg (29 %) de un sólido blanco. En la separación por HPLC semipreparativo se usó un

gradiente de elución isocrático H₂O-MeCN 31%-69%, 0.1% HCOOH durante 60 min. **Primera pareja diastereomérica**: Resultaron 12.5 mg (6 %). **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.23 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H4), 7.12 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H3''), 6.93 (t, *J* = 7.70 Hz, 2H, H5+H6), 6.82 (d, *J* = 8.17 Hz, 2H, H2''), 6.70 (t, *J* = 7.63 Hz, 1H, H7). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 31-69 %, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R* = 38.62 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 407.7

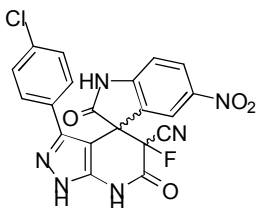
[M+H⁺]. **Segunda pareja diastereomérica:** Resultaron 4 mg (2 %). **P.f.** > 300 °C. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.26 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H4), 7.19 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H3''), 6.98 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H6), 6.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H, H2''+ H5), 6.76 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H7). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 31-69%, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R* = 41.47 (99.9 %). **MS** (ES, modo positivo): *m/z* 407.7 [M+H⁺]. **Análisis elemental:** Calc. para C₂₀H₁₁ClFN₅O₂: C 58.91, H 2.72, N 17.17. Medido para **4.5 a**: C 59.19, H 2.66, N 17.08. Medido para **4.5 b**: C 58.97, H 2.53, N 17.29.

3'-(4-clorofenil)-5,5'-difluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.9 a)



Seguendo el procedimiento general de síntesis de 5'-fluoro-2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 50 mg (0.123 mmol) de **4.8 a** y se obtuvieron 40 mg (77 %) de un sirupo marrón. En la separación por HPLC semipreparativo se usó un gradiente de elución isocrático H₂O-MeCN 31%-69%, 0.1% HCOOH durante 40 min. **Primera pareja diastereomérica:** Resultaron 4.0 mg (7 %). **P.f.** > 300 °C. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12.94 (s, 1H, NH), 11.51 (s, 1H, NH), 7.20 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H3''), 7.12 (td, *J* = 9.1, 2.8 Hz, 1H, H7), 6.96 (dd, *J* = 8.7, 4.4 Hz, 1H, H4), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H2''), 6.69 (dd, *J* = 8.2, 2.7 Hz, 1H, H6). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 179.5 (d, *J* = 5.7 Hz, C2), 158.9 (d, *J* = 251.8 Hz, C6'), 158.7 (d, *J* = 32.4 Hz, C5), 148.1, 140.7, 138.2 (d, *J* = 2.9 Hz), 133.9, 129.7, 129.7, 128.5, 128.5 (d, *J* = 5.7 Hz), 125.4 (m), 121.5 (d, *J* = 30.5 Hz), 119.4 (d, *J* = 20.0 Hz), 115.4 (d, *J* = 20.0 Hz), 112.9 (d, *J* = 7.7 Hz), 71.9 (dd, *J* = 27.2, 4.3 Hz, C4'), 71.2 (d, *J* = 268.1 Hz, C5'). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 31-69%, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R* = 31.39 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 426 [M+H⁺]. **Segunda pareja diastereomérica:** Resultaron 2.0 mg (3 %). **P.f.** > 300 °C. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 13.12 (s, 1H, NH), 11.98 (s, 1H, NH), 11.44 (s, 1H, NH), 7.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H3''), 7.14 (td, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 1H, H7), 7.00 (dd, *J* = 8.6, 4.4 Hz, 1H, H4), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H2''), 6.72 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H6). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 181.1 (d, *J* = 5.7 Hz, C2), 160.5 (d, *J* = 251.8 Hz, C6'), 160.3 (d, *J* = 32.4 Hz, C5), 149.8, 142.4, 139.8 (d, *J* = 2.9 Hz), 135.5, 131.4, 131.3, 127.0 (d, *J* = 5.7 Hz), 127.0 (m), 123.1 (d, *J* = 30.5 Hz), 121.0 (d, *J* = 20.2 Hz), 117.0 (d, *J* = 20.0 Hz), 114.5 (d, *J* = 7.7 Hz), 73.5 (dd, *J* = 27.2, 4.3 Hz C4'), 72.8 (d, *J* = 268.1 Hz, C5'). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 31-69%, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R* = 36.34 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 426 [M+H⁺]. **Análisis elemental:** Calc. para C₂₀H₁₀ClF₂N₅O₂: C 56.42, H 2.37, N 16.45, Cl 8.33. Medido para la primera pareja diastereomérica: C 56.80, H 2.69, N 16.01, Cl 7.96. Medido para la segunda pareja diastereomérica: C 56.03, H 2.22, N 16.16 Cl 8.12.

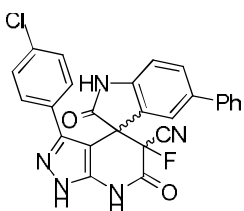
3'-(4-clorofenil)-5,5'-difluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.9 b)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5'-fluoro-2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 50 mg (0.115 mmol) de **4.8 b** y se obtuvieron 40 mg (77 %) de un sirupo naranja. En la separación por

HPLC semipreparativo se usó un gradiente de elución isocrático H₂O-MeCN 30%-70%, 0.1% HCOOH durante 60 min. **Primera pareja diastereomérica:** Resultaron 4 mg (8 %). **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 13.22 (s, 1H, NH), 12.27 (s, 1H, NH), 8.24 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, H4), 7.54 (s, 1H, H1), 7.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H3''), 7.05 (m, 1H, H7), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H2''), 6.55 (m, 1H, H6). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 179.5 (C2), 158.65 (d, *J* = 32.4 Hz, C6'), 148.1, 146.4, 144.0, 140.7, 133.9, 132.1, 130.1, 129.9 (d, *J* = 5.7 Hz, C8), 129.74, 129.71, 128.51, 128.45 (d, *J* = 5.7 Hz, C8'), 121.5 (d, *J* = 30.5 Hz, CN), 111.9, 71.9 (d, *J* = 27.7 Hz, C4'), 71.22 (d, *J* = 268.1 Hz, C5'). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 30-70 %, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R* = 32.41 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 453 [M+H⁺]. **Segunda pareja diastereomérica:** Resultaron 2 mg (4 %). **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12.86 (s, 1H, NH), 11.65 (s, 1H, NH), 8.65 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, H4), 7.68 (s, 1H, H1), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H3''), 7.28 (m, 1H, H7), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H2''), 6.77 (m, 1H, H6). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 178.2 (d, *J* = 5.7 Hz, C2), 159.1 (d, *J* = 32.4 Hz, C6'), 149.6, 145.7, 144.0, 142.0, 132.6, 131.8, 131.0, 130.0, 128.9, 128.5, 128.4, 127.3, 127.3, 126.3, 118.4 (d, *J* = 5.7 Hz, C8'), 112.54, 71.85 (d, *J* = 27.7 Hz, C4'), 71.22 (d, *J* = 268.1 Hz, C5'). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 30-70 %, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R* = 36.74 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 453 [M+H⁺]. **Análisis elemental:** Calc. para C₂₀H₁₀ClF₂N₆O₄: C 53.05, H 2.23, N 18.56, Cl 7.83. Medido para la primera pareja diastereomérica: C 53.53, H 2.12, N 18.42, Cl 8.23. Medido para la segunda pareja diastereomérica: C 52.85, H 2.57, N 18.39, Cl 8.08.

3'-(4-clorofenil)-5'-fluoro-2,6'-dioxo-5-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.9 c)

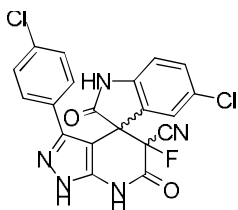


Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5'-fluoro-2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 50 mg (0.107 mmol) de **4.8 c** y se obtuvieron 50 mg (97 %) de un aceite naranja. En la separación por

HPLC semipreparativo se usó un gradiente de elución isocrático H₂O-MeCN 40%-60%, 0.1% HCOOH durante 60 min. **Primera pareja diastereomérica:** Resultaron 4 mg (8 %). **P.f.** > 300 °C.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 13.21 (s, 1H, NH), 11.40 (s, 1H, NH), 7.47 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₄), 7.41 – 7.25 (m, 3H, H₃''+H₇), 7.08 (dd, *J* = 17.8, 8.8 Hz, 6H, Ph + H₆), 6.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H₂''). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 176.4 (C₂), 161.2 (d, *J* = 29.8 Hz, C₆'), 149.2, 143.0, 140.8, 139.3, 136.2, 131.1, 130.7, 130.5, 130.3, (d, *J* = 6.1 Hz, C₈), 130.0, 129.1, 128.5, 128.4 (m), 127.4, 121.4 (d, *J* = 29.7 Hz, CN), 110.5, 71.9 (d, *J* = 29.0 Hz, C₃), 69.7 (d, *J* = 267.5 Hz, C₅'). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 40-60 %, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R* = 22.73 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 484 [M+H⁺]. **Segunda pareja diastereomérica:** Resultaron 2 mg (4 %). **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 13.65 (s, 1H, NH), 11.35 (s, 1H, NH), 7.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₄), 7.61 – 7.40 (m, 3H, H₃''+H₇), 7.12 (dd, *J* = 17.8, 8.8 Hz, 6H, Ph + H₆), 6.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H₂''). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 40-60 %, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R* = 25.31 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 484 [M+H⁺]. **Análisis elemental:** Calc. para C₂₆H₁₅ClFN₅O₂: C 64.54, H 3.12, N 14.47, Cl 7.33. Medido para la primera pareja diastereomérica: C 64.32, H 2.79, N 14.59, Cl 7.75. Medido para la segunda pareja diastereomérica: C 64.46, H 2.96, N 14.81, Cl 8.96.

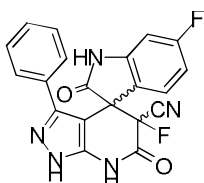
5-cloro-3'-(4-clorofenil)-5'-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina]-5'-carbonitrilo (4.9 d)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5'-fluoro-2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 60 mg (0.141 mmol) de **4.8 d** y se obtuvieron 60 mg (96 %) de un aceite naranja. En la separación por HPLC semipreparativo se usó un gradiente de elución isocrático H₂O-MeCN 36%-64%, 0.1% HCOOH durante 60 min. **Primera pareja diastereomérica:** Resultaron 4 mg (6 %). **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 13.24 (s, 1H, NH), 11.94 (s, 1H, NH), 11.38 (s, 1H, NH), 7.31 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H, H₆), 7.20 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H₃''), 6.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₇), 6.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₂''), 6.79 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₄). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 179.5 (d, *J* = 6.1 Hz, C₂), 158.8 (d, *J* = 35.0 Hz, C₆'), 144.1, 143.3, 140.7, 136.9, 131.1 (C₂''), 131.0 (C₃''), 130.0, 129.0, 128.51, 128.48, 127.4, 127.3, 126.9, 119.7 (d, *J* = 29.6 Hz, CN), 116.2 (C₇), 70.1 (d, *J* = 28.8 Hz, C₅'), 69.7 (d, *J* = 272.2 Hz, C₅'). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 36-64 %, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R* = 21.93. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 443 (99.9%) [M+H⁺]. **Segunda pareja diastereomérica:** Resultaron 4 mg (6 %). **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 13.16 (s, 1H, NH), 12.10 (s, 1H, NH), 11.57 (s, 1H, NH), 7.34 (dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, 1H, H₆), 7.25 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₇), 7.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H₃''), 6.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H₂''), 6.81 (s, 1H, H₄). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 36-64 %, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R* = 25.42 (99.9%). **EM** (ES,

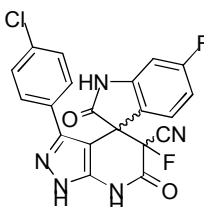
modo positivo): m/z 443 $[M+H]^+$. **Análisis elemental:** Calc. para $C_{20}H_{10}Cl_2FN_5O_2$: C 54.32, H 2.28, N 15.84, Cl 16.03. Medido para la primera pareja diastereomérica: C 53.93, H 1.94, N 16.11, Cl 15.99. Medido para la segunda pareja diastereomérica: C 54.10, H 2.65, N 16.13, Cl 15.87.

3'-fenil-5',6-difluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.9 h)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 5'-fluoro-2,6'-dioxo-3'-fenil-1',5',6',7'-tetrahidrospiro{indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina}-5'-carbonitrilos, se partió de 45 mg (0.110 mmol) de **4.8 h** y se obtuvieron 20 mg (42 %) de un sólido marrón. El compuesto final fue imposible de separar en sus parejas diastereoméricas mediante cromatografía semipreparativa. **P.f.** > 300 °C. **1H RMN** (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 13.17 (s, 1H), 13.10 (s, 1H minor.), 12.04 (s, 1H), 11.88 (s, 1H minor.), 11.40 (s, 1H), 11.21 (s, 1H minor.), 7.33 – 7.11 (m, 6H), 7.08 – 6.92 (m, 4H), 6.87 (t, J = 8.9 Hz, 4H), 6.80 – 6.67 (m, 2H). **HPLC** (H_2O 30 \rightarrow 50 % MeCN, 0.2% HCOOH durante 10 min): t_R = 23.20 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo): m/z 392.0 $[M+H]^+$. **Análisis elemental:** Calc. para $C_{20}H_{11}F_2N_5O_2$: C 61.38, H 2.83, N 17.90. Medido: C 60.97, H 3.12, N 18.18.

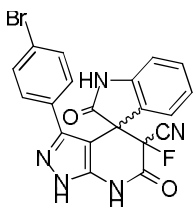
3'-(4-clorofenil)-5',6-difluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.9 e)



Se disuelven **4.8 e** (50 mg, 0.123 mmol) y *Selectfluor* (86.87 mg, 0.246 mmol) en 50 mL de MeOH y se agita a reflujo durante 2h. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 1:1), obteniéndose 12 mg (23 %) de un sólido blanco. El producto final se separa en sus parejas diastereoméricas mediante HPLC semipreparativo usando un gradiente de elución isocrático H_2O -MeCN 33%-67%, 0.1% HCOOH durante 60 min. **Primera pareja diastereomérica:** Resultaron 7.8 (11 %). **P.f.** > 300 °C. **1H RMN** (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.02 (dd, J = 7.5, 5.0 Hz, 1H, H4), 7.41 (d, J = 7.6 Hz, 2H, H3''), 7.27 – 7.15 (m, 3H, H-Ar, H2''+H7), 6.96 (td, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H, H5). **^{13}C RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 181.3 (d, J = 5.4 Hz, C2), 168.2 (d, J = 249.4 Hz, C6), 156.3 (d, J = 28.9 Hz, C6'), 152.2, 145.5, 143.4, 136.6, 132.0 (C2''), 131.8 (C3''), 129.7, 128.5, 127.7, 123.6, 122.5 (d, J = 28.7 Hz, CN), 112.5, 104.1, 71.22 (d, J = 26.8 Hz, C5'), 68.3 (d, J = 25.7 Hz, C3). **HPLC** (Isocrático H_2O -MeCN 33-67 %, 0.1% HCOOH durante 60 min): t_R = 38.27 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo): m/z 426.6 $[M+H]^+$. **Segunda pareja**

diastereomérica: Resultaron 4 mg (6 %). **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.89 (dd, *J* = 7.5, 5.0 Hz, 1H, H₄), 7.58 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{3''}), 7.13 (td, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, H₅), 7.03 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H, H₇), 6.89 – 6.83 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_{2''}). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 179.6 (d, *J* = 5.4 Hz, C₂), 160.4 (d, *J* = 249.4 Hz, C₆), 155.9 (d, *J* = 28.9 Hz, C_{6'}), 151.9, 148.8, 144.3, 135.9, 131.8 (C_{2''}), 131.7 (C_{3''}), 128.6, 127.7, 126.8, 124.0, 121.9 (d, *J* = 28.7 Hz, CN), 115.6, 103.2, 69.9 (d, *J* = 26.8 Hz, C_{5'}), 68.9 (d, *J* = 25.7 Hz, C₃). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 33-67 %, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R* = 40.95 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 426.6 [M+H⁺]. **Análisis elemental:** Calc. para C₂₀H₁₀ClF₂N₅O₂: C 56.42, H 2.37, N 16.45, Cl 8.33. Medido para la primera pareja diastereomérica: C 56.77, H 1.89, N 16.32, Cl 7.95. Medido para la segunda pareja diastereomérica: C 56.32, H 1.93, N 16.78, Cl 7.86.

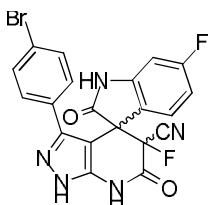
3'-(4-bromofenil)-5'-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.9 f)



Se disuelven **4.8 f** (100 mg, 0.230 mmol) y *Selectfluor* (81.58 mg, 0.238 mmol) en 50 mL de MeOH y se agita a reflujo durante 2 h. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 1:1), obteniéndose 20 mg (19 %) de un sólido beige. El producto final se separa en sus parejas diastereoméricas mediante HPLC semipreparativo usando un gradiente de elución isocrático H₂O-MeCN 33%-67%, 0.1% HCOOH durante 60 min. **Primera pareja diastereomérica:** Resultaron 2.5 mg (2 %). **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.83 (dd, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H, H₄), 7.56 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H₆), 7.54 – 7.46 (m, 4H, H_{2''}+H_{3''}), 7.40 (dd, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H, H₇), 7.16 (td, *J* = 7.4, 1.6 Hz, 1H, H₅). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177.6 (C₂), 154.5 (d, *J* = 34.2 Hz, C_{6'}), 152.2, 145.9, 145.5, 136.7, (C_{3''}), 136.1 (C_{2''}), 132.4, 129.3, 127.8, 125.2 (m, 2C), 124.8, 124.7, 119.1 (d, *J* = 33.5 Hz, CN), 113.7, 73.8 (d, *J* = 27.6 Hz, C₃), 68.7 (d, *J* = 271.7 Hz, C_{5'}). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 33-67 %, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R* = 31.5 (99.9 %). **MS (ES+):** MS (ES, modo positivo): *m/z* 452.0 [M⁺]. **Segunda pareja diastereomérica:** Resultaron 2.2 mg (2 %). **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.94 – 7.73 (m, 2H, H₄+H₆), 7.57 – 7.46 (m, 4H, H_{2''}+H_{3''}), 7.43 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H₅), 7.30 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H, H₇). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 183.6 (d, *J* = 6.1 Hz, C₂), 165.2 (d, *J* = 33.3 Hz, C_{6'}), 146.9, 144.7, 140.7, 132.4, 129.1 (C_{2''}), 128.7 (C_{3''}), 128.5, 126.8, 126.6, 125.2, 124.8, 118.2, 116.8 (d, *J* = 27.2 Hz, CN), 114.6, 77.2 (d, *J* = 28.1 Hz, C₃), 75.2 (d, *J* = 266.3 Hz, C_{5'}). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 33-67 %, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R* = 33.2 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 452.0 [M⁺]. **Análisis elemental:** Calc. para C₂₀H₁₁BrFN₅O₂: C 53.12, H

2.45, N 15.49, Br 17.67. Medido para la primera pareja diastereomérica: C 52.84, H 2.64, N 15.57, Br 18.01. Medido para la segunda pareja diastereomérica: C 53.36, H 2.24, N 15.68, Br 17.42.

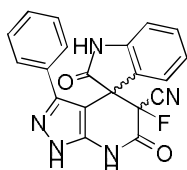
3'-(4-bromofenil)-5',6-difluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.9 g)



Se disuelven **4.8 g** (70 mg, 0.16 mmol) y *Selectfluor* (82.25 mg, 0.23 mmol) en 50 mL de MeOH y se agita a reflujo durante unas 4 h. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 2:1),

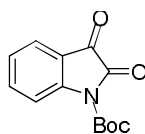
obteniéndose 30 mg (41 %) de un sólido blanco. El producto final se separa en sus parejas diastereoméricas mediante HPLC semipreparativo usando un gradiente de elución isocrático H₂O-MeCN 35%-65%, 0.1% HCOOH durante 60 min. **Primera pareja diastereomérica:** Resultaron 9.5 mg (13 %). **P.f.** > 300 °C. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.66 (s, 1H, NH), 8.22 (dd, *J* = 7.5, 5.1 Hz, 1H, H4), 7.82 – 7.47 (m, 4H, H2''+H3''), 7.14 (td, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H, H5), 6.92 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H, H7). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 179.5 (d, *J* = 5.8 Hz, C2), 173.1 (d, *J* = 29.9 Hz, C6'), 145.9, 140.7, 135.1, 132.5 (C3''), 131.3, 130.1, 129.1, 128.4, 126.8, 123.6, 116.9 (d, *J* = 28.9, CN), 113.72 (d, *J* = 18.9 Hz, C5), 109.0 (d, *J* = 21.1 Hz, C7), 76.4 (d, *J* = 267.6 Hz, C5'), 67.6 (d, *J* = 26.3 Hz, C3). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 35-65 %, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R*=30.7 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 471 [M+H⁺]. **Segunda pareja diastereomérica:** Resultaron 1 mg (1 %). **P.f.** > 300 °C. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.40 (s, 1H, NH), 7.93 (dd, *J* = 7.4, 5.1 Hz, 1H, H4), 7.81 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H3''), 7.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H2''), 7.04 – 6.84 (m, 2H, H5+H7). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 181.3 (d, *J* = 5.8 Hz, C2), 175.5 (d, *J* = 29.9 Hz, C6'), 149.8, 142.2, 138.8, 136.8 (C3''), 133.5, 131.9, 130.8, 129.7, 128.9, 127.4, 119.5 (d, *J* = 28.9, CN), 117.2 (d, *J* = 18.9 Hz, C5), 115.3 (d, *J* = 21.1 Hz, C7), 75.6 (d, *J* = 267.6 Hz, C5'), 68.9 (d, *J* = 26.3 Hz, C3). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 35-65%, 0.1% HCOOH durante 60 min): *t_R*= 33.5 (99.9%). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 471 [M+H⁺]. **Análisis elemental:** Calc. para C₂₀H₁₀BrF₂N₅O₂: C 51.08, H 2.14, N 14.89, Br 16.99. Medido para la primera pareja diastereomérica: C 50.95, H 1.88, N 15.21, Br 17.33. Medido para la segunda pareja diastereomérica: C 51.24, H 2.35, N 14.87, Br 17.01.

3'-fenil-5'-fluoro-2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahidrospiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-b]piridina]-5'-carbonitrilo (4.9 i)



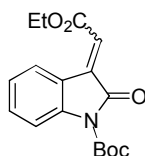
Se disuelven **4.8 i** (150 mg, 0.422 mmol) y *Selectfluor* (224.31 mg, 0.633 mmol) en unos 100 mL de MeOH y se agita a reflujo durante unas 4 h. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 1:1), obteniéndose 90 mg (41 %) de un sólido blanco. El compuesto final fue imposible de separar en sus parejas diastereoméricas mediante cromatografía semipreparativa. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.82 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H4), 7.54 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H7), 7.48 – 7.31 (m, 6H, Ph+H6), 7.13 (t, J = 7.0 Hz, 1H, H5). **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 36-64 %, 0.1% HCOOH durante 60 min): t_R = 30.25 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo): m/z 374.12 (99.9%) [$M+H^+$].

2,3-dioxoindolina-1-carboxilato de *tert*-butilo³³ (4.10)

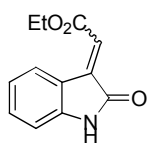


Se disuelven isatina (490 mg, 3.33 mmol), Boc₂O (726.7 mg, 3.33 mmol) y dimetilaminopiridina (4.032 mg, 0.033 mmol) en 20 mL de THF anhidro y se agita la mezcla a t.a. durante 8h. Una vez terminada la reacción, se evapora el disolvente a presión reducida y el residuo se filtra sobre celita, obteniendo 630 mg (76 %) de un sólido amarillo que se usa en el siguiente paso de síntesis sin purificación adicional. **P.f.** 123 °C (bibl. 132 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.13 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H, H7), 7.94 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H, H4), 7.81 (td, J = 8.1, 1.5 Hz, 1H, H6), 7.24 (dd, J = 7.4, 1.9 Hz, 1H, H5), 1.48 (s, 9H, Boc). **HPLC**: t_R = 2.95 (96 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 248.3 [$M+H^+$].

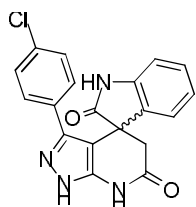
(*E, Z*)-3-(2-etoxi-2-oxoetilideno)-2-oxoindolina-1-carboxilato de *tert*-butilo¹⁹ (4.11)



Se añade 2-(trifenilphosphoranilidene)acetato de etilo (70.45 mg, 0.202 mmol) a una disolución de **4.10** (50 mg, 0.202 mmol) en cloroformo (5 mL) y se agita la mezcla a t.a. durante 30 min. Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 5:1). **P.f.** 183 °C (desc.). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.91 (dd, J = 7.5, 2.0 Hz, 1H, H7), 7.75 (dd, J = 7.5, 2.0 Hz, 1H, H4), 7.35 (td, J = 7.5, 2.0 Hz, 1H, H6), 7.22 (dd, J = 7.5, 2.0 Hz, 1H, H5), 7.06 (s, 1H minor., CH), 6.97 (s, 1H, CH) 4.22 (q, J = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 1.48 (s, 9H, Boc), 1.31 (t, J = 6.0 Hz, 3H, CH₃). **HPLC**: t_R = 3.75 (98 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 318.5 [$M+H^+$].

2-(2-oxoindolin-3-ilideno)acetato de etilo³⁴ (4.12)

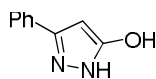
Se disuelve **4.11** (70 mg, 0.224 mmol) en una disolución de AcOEt saturada con HCl (5 mL) y se agita a t.a. durante 30 min. Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se filtra sobre celita, obteniendo 33 mg (68 %) de un sólido blanco que se usa en el siguiente paso de síntesis sin purificación adicional. **P.f.** 112 °C (desc.). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.66 (td, *J* = 7.4, 1.6 Hz, 1H, H₆), 7.51 (ddd, *J* = 21.4, 7.5, 1.5 Hz, 2H, H₄+H₇), 7.22 (td, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H₅), 6.99 (s, 1H minor., C=CH), 6.91 (s, 1H, C=CH), 4.22 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 1.31 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH₃). **HPLC**: *t*_R = 2.25 (96 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 218.3 [M+H]⁺.

3'-(4-clorofenil)-5',7'-dihidroespiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina]-2,6'(1'*H*)-diona (4.13)

Se disuelven **4.12** (30 mg, 0.138 mmol) y **4.7 b** (26.74 mg, 0.138 mmol) en 10 mL de la mezcla de disolventes agua:EtOH:HAc 4:2:1 en un matraz esférico, y se agita la mezcla a reflujo durante 8 h. Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM:MeOH 75:1), obteniendo 14 mg (28 %) de un sólido blanco. **P.f.** > 300 °C (desc.). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₄), 7.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{3''}), 7.45 – 7.38 (m, 2H, H₆+H₇), 7.25 – 7.14 (m, 3H, H_{2''}+H₅), 3.29 (dd, *J* = 108.9, 15.4 Hz, 2H, H_{3'}). **¹³C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 179.61, 169.55, 149.50, 141.80, 134.33, 133.92, 131.32, 129.74, 129.71, 128.51, 127.13, 126.76, 124.45, 108.67, 106.47, 45.69, 42.15. **HPLC**: *t*_R = 2.25 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 364.1 [M]⁺.

Procedimiento general de síntesis de 3-hidroxi-5-fenil-1H-pirazoles

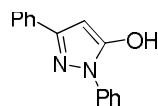
Se disuelve benzoilacetato de etilo (100 mg, 0.47 mmol) en 20 mL de HAc a reflujo, y se añade sobre la disolución la hidrazina correspondiente (0.47 mmol). Se agita a reflujo durante 8 h. Una vez terminada la reacción, se deja enfriar la disolución hasta temperatura ambiente, se elimina el disolvente a presión reducida con calefacción durante 30 minutos, y el residuo se tritura en Et₂O, apareciendo un precipitado que se filtra, se lava con Et₂O frío, se seca y se usa en el siguiente paso de reacción sin purificación adicional.

3-hidroxi-5-fenil-1H-pirazol⁹ (4.14 a)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-hidroxi-5-fenil-1H-pirazoles, se obtiene un sólido blanco con rendimiento cuantitativo. **P.f.** 229 °C

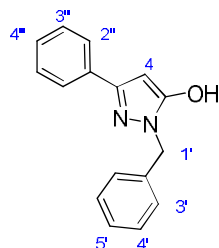
(bibl. 235 – 237 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.66 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, H2'), 7.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H3'), 7.30 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H4'), 5.89 (s, 1H, H4). **HPLC**: *t*_R = 2.78 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 160.8 [M]⁺.

3-hidroxi-2,5-difenil-1*H*-pirazol³⁵ (4.14 b)



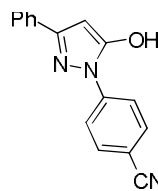
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-hidroxi-5-fenil-1*H*-pirazoles, se obtienen 50 mg (45 %) de un sólido blanco. **P.f.** 127 °C (bibl. 136 – 140 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.81 (s, 1H, OH), 7.82 (d, *J* = 7.3 Hz, 4H, H2'+H2''), 7.63 – 7.23 (m, 6H, H-Ar), 6.02 (s, 1H, H4). **HPLC**: *t*_R = 4.86 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 236.9 [M+H]⁺.

2-benzil-3-hidroxi-5-fenil-1*H*-pirazol³⁶ (4.14 c)



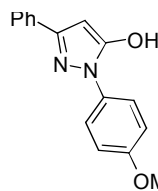
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-hidroxi-5-fenil-1*H*-pirazoles, se obtienen 37 mg (31 %) de un sólido beige. **P.f.** 160 °C (bibl. 149 - 150 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.82 (m, 4H, H3'+H2''), 7.71 – 7.30 (m, 6H, H-Ar), 5.48 (s, 2H, H1'), 5.98 (s, 1H, H4). **HPLC**: *t*_R = 4.02 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 250.9 [M+H]⁺.

2-(4-cianofenil)-3-hidroxi-5-fenil-1*H*-pirazol (4.14 d)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-hidroxi-5-fenil-1*H*-pirazoles, se obtienen 51 mg (41 %) de un sólido marrón. **P.f.** 233 - 236 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.99 – 7.92 (m, 2H, H2'), 7.87 – 7.80 (m, 2H, H3'), 7.77 (m, 2H, H2''), 7.45 – 7.39 (m, 3H, H3''+H4''), 5.71 (s, 1H, H4). **HPLC**: *t*_R = 3.66 (97 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 261.2 [M+H]⁺.

2-(4-metoxifenil)-3-hidroxi-5-fenil-1*H*-pirazol (4.14 e)

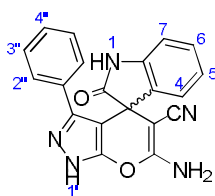


Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-hidroxi-5-fenil-1*H*-pirazoles, se obtienen 47 mg (18 %) de un sólido marrón. **P.f.** 215 °C (desc.). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.77 (m, 2H, H2''), 7.65 – 7.59 (m, 2H, H2'), 7.45 – 7.39 (m, 3H, H3''+H4''), 7.14 – 7.08 (m, 2H, H3'), 5.68 (s, 1H, H4), 3.80 (s, 3H, Me). **HPLC**: *t*_R = 4.68 (98 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 268.2 [M+2H]⁺.

Procedimiento general de síntesis de 6'-amino-3'-fenil-2-oxo-1'H-espiro[indolina-3,4'-pirano[2,3-c]pirazol]-5'-carbonitrilos

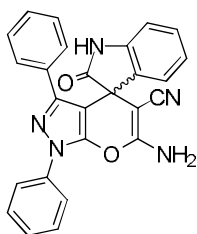
Se disuelven isatina (1 eq.) y malononitrilo (1 eq.) en EtOH, y se agita a t.a. durante 2h. Una vez concluida la reacción, se adiciona gota a gota una disolución del hidroxipirazol correspondiente (1 eq.) y piperidina (20 %mol) en EtOH y la mezcla se agita a t.a. durante una noche. Una vez concluida la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purifica según el método indicado en cada caso.

(*R,S*)-6'-amino-3'-fenil-2-oxo-1'H-espiro[indolina-3,4'-pirano[2,3-c]pirazol]-5'-carbonitrilo³⁷ (4.15 a)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 6'-amino-3'-fenil-2-oxo-1'H-espiro[indolina-3,4'-pirano[2,3-c]pirazol]-5'-carbonitrilos, se partió de 34 mg (0.212 mmol) de **4.14 a**. El residuo se tritura en una mezcla de Et₂O y unas gotas de EtOH. Aparece un precipitado que se filtra, se lava con Et₂O frío y se deja secar, obteniéndose 20 mg (26 %) de sólido marrón. **P.f.** >300 °C (bibl. 280 – 281 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12.82 (s, 1H, NH), 10.48 (s, 1H, NH), 7.29 – 7.20 (m, 2H), 7.19 – 7.10 (m, 3H), 7.03 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.89 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.79 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 6.73 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 177.71, 161.50, 144.12, 140.35, 135.58, 133.18, 130.76, 128.51, 128.45, 127.04, 127.02, 124.38, 114.70, 108.05, 103.40, 51.11, 46.60. **HPLC**: *t_R* = 3.45 (95 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 356.2 [M+H]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₂₀H₁₃N₅O₂: C 67.60, H 3.69, N 19.71. Medido: C 67.95, H 3.57, N 19.20.

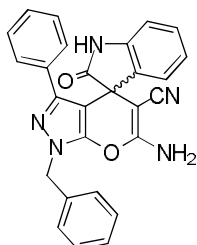
(*R,S*)-6'-amino-1',3'-difenil-2-oxo-1'H-espiro[indolina-3,4'-pirano[2,3-c]pirazol]-5'-carbonitrilo³⁸ (4.15 b)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 6'-amino-3'-fenil-2-oxo-1'H-espiro[indolina-3,4'-pirano[2,3-c]pirazol]-5'-carbonitrilos, se partió de 45 mg (0.190 mmol) de **4.14 b**. El residuo se tritura en mezcla de Et₂O, apareciendo un precipitado que se filtra, se lava con Et₂O frío y se deja secar, obteniéndose 75 mg (91 %) de un sólido beige. **P.f.** 191 °C (desc.) (bibl. 115 - 117 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.60 (s, 1H, NH), 7.91 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.63 – 7.51 (m, 3H), 7.43 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.29 – 7.09 (m, 5H), 6.95 (dd, *J* = 12.4, 7.3 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 177.6, 160.2, 147.4, 145.6, 141.7, 137.1, 133.5, 132.0, 129.5, 129.2, 128.3, 127.9, 127.3, 127.2, 124.8, 122.5, 120.9, 117.7, 109.8, 95.6, 48.1, 43.8. **HPLC** (H₂O 15 → 95 % MeCN, 0.2% HCOOH durante 10 min): *t_R* = 4.71

(95 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 432.2 $[M+H]^+$. **Análisis elemental**: Calc. para $C_{26}H_{17}N_5O_2$: C 72.38, H 3.97, N 16.23. Medido: C 71.89, H 4.21, N 15.88.

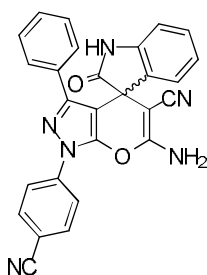
(*R,S*)-1'-bencil-6'-amino-3'-fenil-2-oxo-1'*H*-espiro[indolina-3,4'-pirano[2,3-*c*]pirazol]-5'-carbonitrilo (4.15 c)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 6'-amino-3'-fenil-2-oxo-1'*H*-espiro[indolina-3,4'-pirano[2,3-*c*]pirazol]-5'-carbonitrilos, se partió de 35 mg (0.140 mmol) de **4.14 c**. El residuo se purifica mediante cromatografía en capa fina semipreparativa sobre gel de sílice (DCM:MeOH 10:1), obteniéndose 35 mg (56 %) de un sólido blanco. **P.f.** 223 °C (desc.). **¹H RMN**

(300 MHz, Metanol- d_4) δ (ppm): 8.00 (s, 1H, NH), 7.33 – 7.15 (m, 3H), 7.00 (m, 4H), 6.82 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H7), 5.14 (d, J = 26.0 Hz, 2H, CH₂). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 177.74, 160.28, 145.90, 141.70, 136.10, 134.06, 133.58, 132.48, 130.01, 129.12, 128.84, 127.99, 127.88, 127.82, 127.76, 127.35, 126.94, 124.56, 122.47, 117.79, 109.81, 93.39, 57.66, 50.75, 48.37, 24.69. **HPLC**: t_R = 4.54 (95 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 446.2 $[M+H]^+$. **Análisis elemental**: Calc. para $C_{27}H_{19}N_5O_2$: C 72.80, H 4.30, N 15.72. Medido: C 73.13, H 4.18, N 16.28.

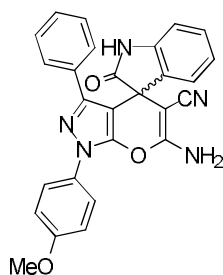
(*R,S*)-6'-amino-1'-(4-cianofenil)-3'-fenil-2-oxo-1'*H*-espiro[indolina-3,4'-pirano[2,3-*c*]pirazol]-5'-carbonitrilo (4.15 d)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 6'-amino-3'-fenil-2-oxo-1'*H*-espiro[indolina-3,4'-pirano[2,3-*c*]pirazol]-5'-carbonitrilos, se partió de 20 mg (0.073 mmol) de **4.14 d**. El residuo se purifica por cromatografía en capa fina semipreparativa sobre gel de sílice (DCM:MeOH 20:1), obteniéndose 14 mg (10 %) de un sólido rojizo. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.10 (d, J = 7.5 Hz, 2H, N-C-CH), 7.83 (d, J = 7.5 Hz,

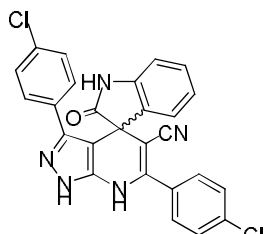
2H, N-C-CH-CH), 7.73 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H4), 7.48 – 7.31 (m, 6H, Ph+H6), 7.22 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H5), 7.15 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H7). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 177.71, 154.39, 140.35, 139.97, 136.14, 135.88, 133.18, 132.30, 130.76, 128.73, 128.69, 128.43, 127.04, 127.02, 124.38, 121.28, 118.82, 114.70, 111.63, 108.05, 106.11, 49.79, 46.88. **HPLC**: t_R = 4.54 (95 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 446.2 $[M+H]^+$. **Análisis elemental**: Calc. para $C_{27}H_{16}N_6O_2$: C 71.05, H 3.53, N 18.41. Medido: C 70.87, H 3.45, N 18.25.

(*R,S*)-6'-amino-3'-fenil-1'-(4-metoxifenil)-2-oxo-1'-*H*-espiro[indolina-3,4'-pirano[2,3-*c*]pirazol]-5'-carbonitrilo (4.15 e)



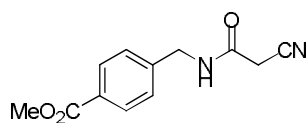
Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 6'-amino-3'-fenil-2-oxo-1'-*H*-espiro[indolina-3,4'-pirano[2,3-*c*]pirazol]-5'-carbonitrilos, se partió de 42 mg (0.150 mmol) de **4.14 e**. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 1:1), obteniéndose 30 mg (42 %) de un sólido rosa pálido. **P.f.** 223 °C (desc.). **¹H RMN** (300 MHz, Metanol-*d*₄) δ (ppm): 10.75 (s, 1H, NH), 7.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.67 (s, 2H), 7.42 – 7.32 (m, 3H), 7.31 – 7.21 (m, 3H), 7.15 – 7.03 (m, 3H), 6.95 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H, OMe). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 178.0, 160.7, 158.6, 147.2, 145.7, 142.0, 134.0, 132.5, 130.5, 129.6, 128.6, 128.2, 127.6, 125.1, 123.3, 122.8, 118.1, 114.9, 110.2, 95.4, 57.9, 55.9, 48.6. **HPLC**: *t_R* = 4.69 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 462.1 [M+H]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₂₇H₁₉N₅O₃: C 70.27, H 4.15, N 15.18. Medido: C 69.98, H 3.87, N 14.96.

3',6'-bis(4-clorofenil)-2-oxo-1',7'-dihidroespieo[indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina]-5'-carbonitrilo (4.16)



A una suspensión de isatina (31 mg, 0.21 mmol) en agua (20 mL), se añade **4.2** (40 mg, 0.21 mmol) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante unas 48 h. Una vez terminada la reacción, se añade HAc gota a gota hasta que el precipitado del crudo de reacción se redissuelve, seguido de 4-clorobenzoilacetonitrilo (37.1 mg, 0.21 mmol), y se agita a reflujo durante 8h. Una vez terminada la reacción, se filtra el precipitado formado, se lava con Et₂O y se deja secar, resultando 50 mg (50 %) de un sólido beige. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.79 (s, 1H, NH), 10.52 (s, 1H, NH), 10.43 (s, 1H, NH), 7.59 (s, 3H, H-Ar), 7.22 (dd, *J* = 15.5, 8.0 Hz, 4H, H3''+H3'''), 6.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H7), 6.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H, H2''+H2'''). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 178.3, 172.4, 151.6, 147.6, 141.3, 138.1, 136.0, 135.3, 133.7, 132.9, 130.9, 129.7, 129.4, 128.9, 128.5, 125.3, 122.9, 119.4, 110.1, 99.5, 99.1, 50.9. **HPLC**: *t_R* = 4.53 (99 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 484.1 [M⁺]. **Análisis elemental**: Calc. para C₂₆H₁₅Cl₂N₅O: C 64.48, H 3.12, N 14.46, Cl 14.64. Medido: C 64.27, H 2.87, N 14.68, Cl 14.87.

4-((2-cianoacetamido)metil)benzoato de metilo (4.17)

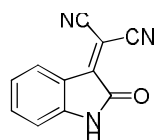


Se disuelven 4-aminometilbenzoato de metilo (316 mg, 1.91 mmol) y ácido cianoacético (147.9 mg, 1.74 mmol) en unos 25 mL de THF anhidro y se agita la mezcla a temperatura ambiente mientras se añade gota a gota una disolución de DCC (359.01 mg, 1.74 mmol) en EtOH, apareciendo un precipitado blanco. La mezcla se agita a t.a. durante una noche. Una vez terminada la reacción, se filtra el crudo de reacción y las aguas de filtrado se concentran hasta sequedad a presión reducida. El residuo se tritura con EtOH y el precipitado resultante se filtra, se lava con EtOH y se deja secar, obteniendo 310 mg (72 %) de un sólido blanco. **P.f.** 212 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.82 (s, 1H, NH), 7.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H₂), 7.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H₃), 4.38 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂-N), 3.85 (s, 3H, Me), 3.74 (s, 2H, CH₂-CN). **HPLC**: *t_R* = 3.68 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 233.4 [M+H]⁺.

Procedimiento general de síntesis de 3-(dicianometiliden)-2-oxo-indolinas

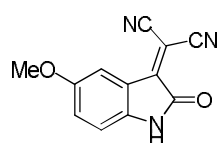
A una disolución de la isatina correspondiente (1 eq.) en EtOH (6 mL/mmol) se añade malononitrilo (1 eq.) y piperidina (20 %mol). La mezcla se agita a 90 °C durante 10 minutos. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 2:1).

3-(dicianometiliden)-2-oxo-indolina⁶ (4.18 a)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(dicianometiliden)-2-oxo-indolinas, se partió de 500 mg (3.400 mmol) de isatina y se obtuvieron 440 mg (68 %) de un sólido violeta. **P.f.** 220 – 222 °C (blibl. 236 – 240 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.64 (s, 1H, NH), 7.46 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H₄), 7.41 (td, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 1H, H₆), 7.32 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H₇), 7.15 (td, *J* = 7.4, 1.6 Hz, 1H, H₅). **HPLC**: *t_R* = 4.47 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 197.5 [M+2H]⁺.

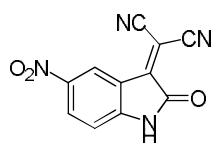
3-(dicianometiliden)-5-metoxi-2-oxo-indolina (4.18 b)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(dicianometiliden)-2-oxo-indolinas, se partió de 500 mg (2.822 mmol) de 5-metoxiisatina y se obtuvieron 310 mg (49 %) de un sólido rojo oscuro. **P.f.** 275 – 280 °C. **¹H**

RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.00 (s, 1H, NH), 7.38 (s, 1H, H7), 7.20 (s, 1H, H4), 6.87 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H6), 3.76 (s, 3H, Me). **HPLC**: t_R = 5.02 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 226.6 $[M+H]^+$.

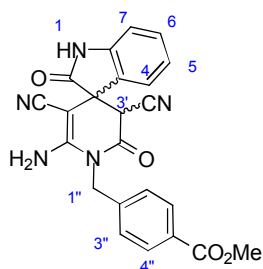
3-(dicianometiliden)-5-nitro-2-oxo-indolina (4.18 c)



Siguiendo el procedimiento general de síntesis de 3-(dicianometiliden)-2-oxo-indolinas, se partió de 500 mg (2.602 mmol) de 5-nitroisatina y se obtuvieron 250 mg (41 %) de un sólido naranja. **P.f.** 312 – 315 °C. **1H RMN**

(300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.93 (s, 1H, NH), 8.67 (s, 1H, H7), 8.44 (s, 1H, H4), 7.16 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H6). **HPLC**: t_R = 3.58 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 239.90 $[M-H]^+$.

(3*R*, 3*S*, 4'*R*, 4'*S*)-4-((6'-amino-3',5'-diciano-2,2'-dioxo-2',3'-dihidro-1'*H*-espiro[indolina-3,4'-piridina]-1'-il)metil)benzoato de metilo (4.19 a)



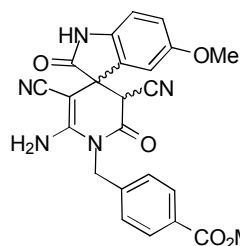
Se disuelve **4.17 b** (100 mg, 0.51 mmol), **4.18 a** (118.91 mg, 0.51 mmol) y piperidina (0.021 mL, 40 %mol) en 20 mL de EtOH. La mezcla se agita a reflujo durante una noche. Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se disuelve en AcOEt y se extrae con agua acidulada con HCl concentrado a pH = 5. La fase acuosa resultante se trata con una disolución de NaOH concentrada

hasta pH = 9 – 10 y se extrae con AcOEt. La nueva fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, y se concentra a presión reducida, obteniendo 20 mg (9 %) de un sólido rojo. **P.f.** 211 - 213 °C. **1H**

RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7.87 (d, J = 7.1 Hz, 2H, H3''), 7.76 (td, J = 7.3, 1.1 Hz, 2H, H2''), 7.43 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H4), 7.35 (d, J = 6.2 Hz, 1H, H6), 7.26 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H5+H7), 5.88 (dd, J = 77.6, 12.2 Hz, 1H, CH₂), 5.30 (s, 1H, H3'), 4.99 (s, 1H, H3'), 3.95 (s, 1H, COOMe). **^{13}C**

RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 177.1, 166.4, 163.0, 155.7, 142.7, 141.8, 130.5, 129.4, 128.8, 127.8, 127.4, 125.2, 123.0, 118.5, 114.3, 110.8, 57.8, 56.4, 52.5, 48.8, 44.6, 42.6, 39.9, 18.9. **HPLC**: t_R = 3.94 (98 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 428.2 $[M+H]^+$. **Análisis elemental**: Calc. para C₂₃H₁₇N₅O₄: C 64.63, H 4.01, N 16.39. Medido: C 65.02, H 3.98, N 15.89.

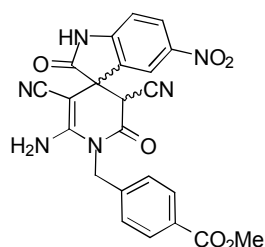
(3*R*,3*S*,4'*R*,4'*S*)-4-((6'-amino-3',5'-diciano-5-metoxi-2,2'-dioxo-2',3'-dihidro-1'*H*-espiro[indolina-3,4'-piridina]-1'-il)metil)benzoato de metilo (4.19 b)



Se disuelve **4.17 b** (51.56 mg, 0.22 mmol), **4.18 b** (50 mg, 0.22 mmol) y piperidina (0.004 mL, 20 %mol) en 15 mL de EtOH. La mezcla se agita a reflujo durante una noche. Una vez terminada la reacción, se filtra el precipitado del crudo, se lava con una disolución acuosa de NaOH de pH = 9 – 10 y se deja secar, obteniendo 65 mg (64 %) de un sólido

marrón. **P.f.** 205 - 209 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10.66 (s, 1H, NH), 7.93 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H7), 7.60 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H6), 7.10 (m, 3H, H3''+H4), 6.89 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H2''), 5.66 (s, 1H, H3'), 5.42 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H, CH₂), 5.20 (s, 1H minor., H3'), 5.01 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H, CH₂), 3.86 (s, 3H, COOMe), 3.76 (s, 3H, OMe). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 180.34, 168.59, 158.79, 157.51, 152.39, 138.58, 138.00, 132.82, 128.57, 126.92, 124.89, 115.82, 115.23, 113.88, 112.76, 110.08, 59.09, 55.51, 52.37, 48.76, 48.46, 47.89. **HPLC**: *t_R* = 3.96 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 458.2 [M+H]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₂₄H₁₉N₅O₅: C 63.02, H 4.19, N 15.31. Medido: C 62.89, H 4.53, N 15.66.

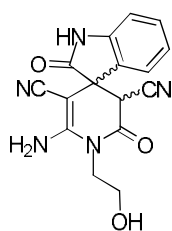
(3*R*,3*S*,4'*R*,4'*S*)-4-((6'-amino-3',5'-diciano-5-nitro-2,2'-dioxo-2',3'-dihidro-1'*H*-espiro[indolina-3,4'-piridina]-1'-il)metil)benzoato de metilo (4.19 c)



Se disuelve **4.17 b** (48.53 mg, 0.21 mmol), **4.18 c** (50 mg, 0.21 mmol) y piperidina (0.004 mL, 20 %mol) en 15 mL de EtOH. La mezcla se agita a reflujo durante una noche. Una vez terminada la reacción, se filtra el precipitado del crudo, se lava con una disolución acuosa de NaOH de pH = 9 – 10 y se deja secar, obteniendo 20 mg (20 %) de un sólido

marrón. **P.f.** 266 - 270 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.46 (s, 1H, NH), 8.29 – 8.14 (m, 3H, H-Ar), 7.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H3''), 7.24 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H2''), 7.04 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H7), 4.51 (s, 1H, H3'), 4.33 (s, 1H minor., H3'), 3.86 (s, 3H, COOMe). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 180.3 (C2), 168.6 (COOMe), 156.5 (C6'), 154.7 (C2'), 145.1 (C5), 143.0, 141.7, 132.7, 128.6 (C4''), 127.6, 127.1, 126.9 (C3''), 122.5, 116.9, 115.8, 106.8, 60.7 (C3'), 54.1 (Me), 48.8 (C3), 48.5 (C1''), 45.3 (C5'). **HPLC**: *t_R* = 5.23 (98 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 473.33 [M+H]⁺. **Análisis elemental**: Calc. para C₂₃H₁₆N₆O₆: C 58.48, H 3.41, N 17.79. Medido: C 58.33, H 3.24, N 18.09.

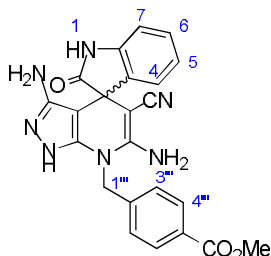
(3*R*, 3*S*, 4'*R*, 4'*S*)-6'-amino-1'-(2-hidroxietil)-2,2'-dioxo-2',3'-dihidro-1'*H*-espiro[indolina-3,4'-piridina]-3',5'-dicarbonitrilo (4.19 d)



Se disuelve **4.17 a** (76.16 mg, 0.39 mmol), **4.18 a** (50 mg, 0.39 mmol) y piperidina (0.156 mL, 40 %mol) en 15 mL de EtOH. La mezcla se agita a t.a. durante 48h. Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se tritura en AcOEt. Se filtra el precipitado resultante, y se purifica por HPLC semipreparativo con un gradiente de elución isocrático

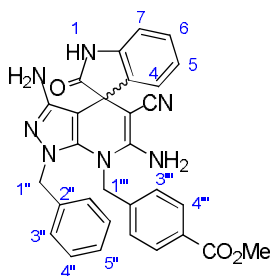
H₂O-MeCN 15%-85%, 0.1% HCOOH durante 40 min., obteniendo 6.1 mg (4.8 %) de un sólido blanco. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.61 – 7.13 (m, 6H, H₄+H₅+H₆+H₇), 5.15-4.80 (m, 2H, N-CH₂), 4.79 (s, 1H, H_{3'}), 4.39 (s, 1H, H_{3'}), 4.26 – 3.87 (m, 2H, CH₂-OH), 3.43 (d, J = 3.1 Hz, 1H, OH). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 180.34, 161.91, 154.64, 141.77, 132.42, 127.77, 127.14, 124.34, 115.82, 113.88, 108.62, 60.28, 59.09, 52.96, 49.20, 45.02, 37.91. **HPLC** (Isocrático H₂O-MeCN 15-85 %, 0.1% HCOOH durante 40 min): *t_R* = 23.6 (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 325.3 [M+2H]⁺. **Análisis elemental:** Calc. para C₁₆H₁₃N₅O₃: C 59.44, H 4.05, N 21.66. Medido: C 59.62, H 4.33, N 21.98.

(*R,S*)-4-((3',6'-diamino-5'-ciano-2-oxoespiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina]-7'(1'*H*)-il)metil)benzoato de metilo (4.20 a)



Se disuelve **4.19 a** (60 mg, 0.145 mmol) en hidrato de hidrazina (5 mL) y se agita a reflujo durante 2 h y a t.a. durante 8h más. Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se tritura en una mezcla EtOH:Et₂O 1:1, resultando 40 mg (62 %) de un sólido blanco. **P.f.** > 300 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 9.88 (s, 2H, NH₂), 9.73 (s, 2H, NH₂), 7.78 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H_{4''}), 7.42 – 7.30 (m, 3H, H_{3''}+H₆), 7.15 – 7.03 (m, 1H, H₅), 6.94 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H₇), 6.71 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H₄), 5.61 – 5.54 (m, 2H, CH₂), 3.79 (s, 3H, Me). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 181.93, 173.45, 166.32, 162.19, 155.35, 143.39, 141.57, 131.66, 127.65, 127.43, 127.19, 127.07, 126.35, 124.92, 121.86, 109.19, 55.23, 51.26, 41.61. **HPLC:** *t_R* = 2.70 (96 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 428.3 [M⁺]. **Análisis elemental:** Calc. para C₂₃H₁₉N₇O₃: C 62.58, H 4.34, N 22.21. Medido: C 62.78, H 3.99, N 21.87.

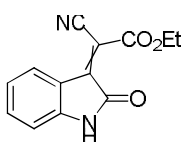
(*R,S*)-4-((3',6'-diamino-1'-bencil-5'-ciano-2-oxoespiro[indolina-3,4'-pirazol[3,4-*b*]piridina]-7'(1'*H*)-il)metil)benzoato de metilo (4.20 b)



Se disuelven **4.20 b** (40 mg, 0.10 mmol) y benzilhidrazina (200 mg, 1.64 mmol) en EtOH (10 mL) y se agita a t.a. durante 8h. Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 2:1), resultando 30 mg (60 %) de un sólido blanco.

P.f. 281 – 284 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.00 (s, 1H, NH), 8.58 (s, 1H, NH), 8.24 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H4), 7.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H4'''), 7.36 – 6.99 (m, 10 H, H-Ar), 5.76 (s, 2H, NH₂), 5.46 (dd, *J* = 43.9, 15.2 Hz, 2H, H1''), 4.64 (dd, *J* = 34.4, 15.2 Hz, 2H, H1'''), 3.85 (s, 3H, Me). **HPLC**: *t_R* = 4.29 (98 %). **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 539.2 [M+8H⁺].

(*E, Z*)-2-ciano-2-(5-nitro-2-oxoindolina-3-ilideno)acetato de etilo (4.21)



Se disuelve isatina (196 mg, 1.33 mmol), cianoacetato de etilo (150.45 mg, 1.33 mmol) y piperidina (0.067 mL, 20 %mol) en 20 mL de EtOH. La mezcla se agita a 90 °C durante 10 minutos. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (hex:AcOEt 1:1), resultando 230 mg (71 %) de un sólido rojo oscuro. **P.f.** 190 – 192 °C (bibl. 194 – 196 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.66 (td, *J* = 7.4, 1.6 Hz, 1H, H6), 7.61 (dd, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 1H, H4), 7.45 (dd, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 1H, H7), 7.24 (td, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 1H, H5), 4.24 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 1.30 (t, *J* = 5.8 Hz, 3H, CH₃). **HPLC**: *t_R* = 3.25 (97 %). **EM** (ES, modo positivo) *m/z* 243.90 [M+H]⁺.

(3*R*, 3*S*, 4'*R*, 4'*S*)-2,2',6'-trioxoespiro[indolina-3,4'-piperidina]-3',5'-dicarbonitrilo (4.22)



Se disuelve **4.21** (100 mg, 0.41 mmol) en 20 mL de EtOH. La disolución se enfría a 0 °C con baño de hielo y se añade gota a gota una disolución de NaOEt en EtOH al 21% en peso (0.134 mL, 0.41 mmol) seguida de cianoacetamida (34.73 mg, 0.41 mmol). La mezcla se deja alcanzar t.a. y se agita a esta temperatura durante 5h. Una vez finalizada la reacción, se elimina aproximadamente la mitad del volumen de disolvente a presión reducida, tras lo cual se añaden unos 5 mL de agua y se añade gota a gota una disolución de HCl concentrada hasta alcanzar pH = 1. Aparece entonces un precipitado que se filtra, se lava con agua fría y se deja secar, resultando 51 mg (44 %) de sólido marrón. **P.f.** 260 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.36 (s, 1H, NH), 11.44 (s, 1H, NH), 7.56 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H7), 7.43 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H6), 7.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H5), 7.03

(d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H4), 5.59 (s, 1H, H3'), 5.24 (s, 1H minor., H3'). **HPLC:** $t_R = 3.33$ (99.9 %). **EM** (ES, modo positivo) m/z 281.0 [M]⁺.

4.5.3 Ensayos in vitro de activación de AMPK

La actividad de la enzima AMPK en los ensayos de activación *in vitro* se evaluó usando una metodología basada en tecnología *Delfia*³⁹. Las actividades de la enzima se midieron en placas microtituladoras en presencia de un péptido sustrato sintético (AMARAASAAALARRR, o péptido "AMARA") y activadores en diluciones en serie. Las reacciones se iniciaron a través de la adición de AMPK. La actividad de la enzima se mide usando un anticuerpo anti-fosfoserina para medir la cantidad de fosfato incorporado a "AMARA". Buffer de reacción: Hepes 50 mM; pH=7.4; [ATP]=125mM; [MgCl₂]=19mM; Incubación de 30 min. a 30 °C.

4.5.4 Medidas de la activación en células de AMPK

La línea celular utilizada para los tratamientos con los 15 diferentes reactivos ensayados fue HEK293T (células embrionarias de riñón humano). Las células crecieron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con 25 mM de glucosa suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado, 2 mM glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin en una atmósfera húmeda a 37°C con un 5% de CO₂. Las células se sembraron en placas de 60 mm (p.60) para obtener un 70-80% de confluencia y se lavaron en tampón *Krebs Ringer* (KRB: NaCl 12,5 mM, CaCl₂ 15 mM, KH₂PO₄ 0,5 mM, KCl 3 mM, NaHCO₃ 2,5 mM, MgSO₄ 0,5 mM, HEPES 10 mM pH 7,4, 95:5 O₂ /CO₂) a 37°C. A continuación, se trataron durante 1 h a 37°C en la estufa de cultivos, añadiendo a cada una de ellas las cantidades adecuadas de los compuestos a estudiar (*stock* 5 mM en DMSO) disueltos en KRB/25 mM glucosa para alcanzar las concentraciones finales. Como control de activación se usó fenformina 5 mM.

Obtención de extractos de células HEK293T

Tras los correspondientes tratamientos, se eliminó el sobrenadante y se congelaron rápidamente en N₂ líquido. Las placas fueron procesadas una por una, y mantenidas en hielo, añadiendo en primer lugar el tampón de lisis frío. La composición del tampón era la siguiente: Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 15 mM pH 8,0, NaF 50 mM, Na₄P₂O₇ 15 mM, sacarosa 0,6 M, 2-

Mercaptoetanol 15 mM, una mezcla de inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche) y PMSF 1 mM. Las células se recogieron en tampón de lisis con la ayuda de un rascador y fueron lisadas pasándolas por jeringas de 24 Gx5/8" 4 veces cada muestra. Se reservó una pequeña cantidad para medir la cantidad de proteína mediante Bradford y al resto se le añadió tampón de carga para electroforesis y se hirvió durante 5 min, manteniéndose a -20°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford, con el *Bio-Rad Bradford Protein Assay Reagent (BioRad)*.

Análisis de proteínas mediante western blot

Los extractos de proteínas se analizaron por SDS-PAGE en geles del 8 o del 10% de acrilamida y de 1,5 mm de grosor. Se cargaron 30 µg de proteína y se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore) durante 1,5 h a 100 V. El bloqueo se hizo con 5% de leche desnatada en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó incubando el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados a temperatura ambiente con TBS-T de 10 min cada uno, se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado a HRP. Después de tres lavados de 10 min a temperatura ambiente con TBS-T, las membranas se revelaron con ECL *plus* (Pierce) y se procesaron con un equipo FUJI LAS 3000 (*Fujifilm*). Los anticuerpos utilizados fueron: Anti-pAMPKαThr172, anti-AMPKβ1/β2, anti-ACC y anti-pACCser79 de la casa *Cell Signaling Technology* (Danvers, MA, USA) diluidos 1/1000. El anticuerpo secundario *goat anti-rabbit HRP* de la casa Santa Cruz Technology a una dilución 1/5000 ó 1/10000. La detección de bandas con los 31 anticuerpos Anti-pAMPKαThr172 y anti-pACCser79 (sustrato de AMPK) respecto de sus controles de carga respectivos (anti-AMPKβ1/β2 y anti-ACC) se tomó como indicativo de activación de AMPK.

Las células Hek293 son tratadas con 30 µg del compuesto a estudiar durante 1 hora. Las células lisadas son analizadas mediante *Western Blot* usando anti-phosphoThr172 AMPK alfa, anti-AMPKb1 (usado como control de carga), anti-phosphoSer79ACC y anti-ACC (usado como control de carga).

4.5.5 Ensayos de fosforilación de AMPK vascular

Cultivos celulares

Los cultivos se realizaron en una línea celular de endotelio de aorta de bovino (BAE-1, colección europea ECACC). Las células se sembraron en frascos de 75 cm² en medio de cultivo *Dulbecco's modification of Eagle's medium* (DMEM, Lonza, EE.UU.) suplementado con L-glutamina (2 mM, Lonza, EE.UU.), 10% de suero fetal bovino (SFB, Lonza, EE.UU.), penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) (Lonza, EE.UU.). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en atmósfera de humedad y 5% de CO₂. Cuando las células estuvieron subconfluentes (70-80%) se llevaron a cabo subcultivos utilizando tripsina-EDTA (0.25%, SIGMA, EE.UU.). Los diferentes experimentos se realizaron en subcultivos entre los pases 3 al 6.

Estudio de la expresión de AMPK y pAMPK mediante western blot

Obtención de las muestras a partir de las células (BAE-1). Para la detección de la proteína objeto de estudio, se sembraron las células en placas de 6 pocillos a una densidad de 100.000 células por pocillo. Una vez alcanzado un estado de confluencia del 90-95% se aspiró el medio, se lavó cada pocillo 2 veces con 1 ml de PBS, y las células se sometieron a un ayuno total sustituyendo el medio completo por otro medio que contenía DMEM suplementado con 0,1% de BSA. Este ayuno se mantuvo durante 24 h. Transcurridas las mismas, se aspiró el medio y las células se incubaron durante 15 min en 1 ml de DMEM con el compuesto objeto de estudio (5, 10, 25, 50 y 100 µM). Algunos pocillos se incubaron durante 15 min con el activador de la AMPK, 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotido (AICAR, 1mM).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se aspiró el medio, las células se lisaron con ayuda de un rascador y se recogió el contenido de 3 pocillos en 200 µl de buffer de lisis frío [0,42 mM NaCl, 1 mM Na₄P₂O₇, 1mM ditioneitol (DTT), 20mM HEPES, 20mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 20% glicerol, 2mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1µl/ml leupeptina, 1µl/ml aprotinina y 0,5µl/ml N-α-p-tosil-l-lisina en clorometilcetona (TLCK)]. El lisado así obtenido se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min y seguidamente se homogeneizó con ayuda de un *potter*. El homogeneizado resultante se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min a 4°C (*Microfuge 22R, Beckman Coulter*) y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se conservó a -80°C hasta la realización de los experimentos de WB. A 30 µl de sobrenadante se añadieron 5 µl de reactivo de Laemli [50 mM Tris (pH = 6.8), 10%

glicerol, 10% dodecil sulfato sódico (SDS), 5% β -mercaptoetanol, 2 mg/ml azul de bromofenol]

Detección de proteínas por western blot. Las proteínas presentes en la muestra se separaron mediante electroforesis, usando un sistema *Mini Protean 3* (Bio-Rad, EE.UU.). Las muestras se hirvieron en un baño a 100°C durante 5 min y se cargaron (30 μ l/pocillo) en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10% [4.1 ml H₂O, 2.5 ml Tris-HCl 1.5M (pH: 8.8), 0.05 ml SDS 20%, 3.3 ml acrilamida/bisacrilamida al 30%, 0.05 ml amonio persulfato 10%, 0.005 ml TEMED] y se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturizantes a 200 V durante 45 min a temperatura ambiente y en un tampón electrodo (0,2M glicina; 0,025M Tris y 0,1% SDS). Como marcador de peso molecular se utilizó *Precision Plus Protein™, All blue standard* (BIO-RAD, España).

Tras la electroforesis, se transfirieron las proteínas del gel de acrilamida a una membrana de polifluoruro de vinilideno o de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,2 μ m a través de un sistema de transferencia a 25 V durante 7 min (*Trans-Blot Turbo Transfer*, Bio-Rad, EE.UU.). Las membranas se lavaron 2 veces durante 5 min en agitación con una solución de lavado [leche en polvo desnatada al 0,1% en tampón fosfato salino con 0,5% Tween 20 (PBS-T)]. Para evitar uniones inespecíficas, las membranas se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente en agitación con una solución de bloqueo (5% leche en polvo desnatada en PBS-T). Posteriormente, se lavaron 3 veces durante 5 min.

Para determinar la expresión de la AMPK α (62 KDa) y de su forma fosforilada en el resto Thr172 (p-AMPK α ; 62 KDa), se utilizaron como anticuerpos primarios anticuerpos policlonales de conejo contra la proteína AMPK α o p-AMPK α (Thr¹⁷²), respectivamente (1:1000, *Cell Signalling Technology*, EE.UU.), que se incubaron a 4°C durante 24 h

Al día siguiente, se lavaron las membranas 4 veces (2 veces durante 10 min y 2 veces durante 5 min) y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente y en agitación con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con peroxidasa (1:5000, *Sigma-Aldrich*, EE.UU.). El anticuerpo secundario se preparó en una solución de leche en polvo desnatada al 1% en PBS-T. Seguidamente, se lavaron de nuevo las membranas 3 veces durante 5 min para eliminar los restos del anticuerpo secundario. La detección de las distintas proteínas se realizó por quimioluminiscencia, mediante un kit de detección (*enhanced chemiluminescence ECL Prime*, Amersham Bioscience, Reino Unido) y posterior exposición en un sistema de detección y adquisición de imagen *ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad, EE.UU.).

Sobre las mismas membranas se determinó la expresión de la proteína β -actina como control de carga. Se utilizó un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti β -actina (1:5000, Sigma-Aldrich), y un anticuerpo secundario (IgG) anti-ratón marcado con peroxidasa (1:5000, Amersham Bioscience, Reino Unido). La cuantificación de las bandas obtenidas se realizó mediante el programa informático *Image Lab* 3.0 (Bio-Rad, EE.UU) y se expresó como la relación entre ambas proteínas (p-AMPK/ AMPK).

Cada resultado en el *western blot* de la **figura 4.9** representa la media \pm E.S. (n=3 repetido 2 veces). *p<0,05, **p<0,001 respecto al grupo control (test de la t de Student).

Bibliografía del capítulo 4

1. Rahmati, A.; Kenarkoohi, T.; Khavasi, H. R., Synthesis of 2,6'-dioxo-1',5',6',7'-tetrahydrospiro[indoline-3,4'-pyrazolo[3,4-b]pyridine]-5'- carbonitriles via a one-pot, three-component reaction in water. *ACS Combinatorial Science* **2012**, *14* (12), 657-664.
2. Biggs-Houck, J. E.; Younai, A.; Shaw, J. T., Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14* (3), 371-382.
3. Illgen, K.; Enderle, T.; Broger, C.; Weber, L., Simulated molecular evolution in a full combinatorial library. *Chemistry and Biology* **2000**, *7* (6), 433-441.
4. Sunderhaus, J. D.; Martin, S. F., Applications of multicomponent reactions to the synthesis of diverse heterocyclic scaffolds. *Chemistry - A European Journal* **2009**, *15* (6), 1300-1308.
5. Jimonet, P.; Ribeill, Y.; Bohme, G. A.; Boireau, A.; Chevé, M.; Damour, D.; Doble, A.; Genevois-Borella, A.; Herman, F.; Imperato, A.; Le Guern, S.; Manfré, F.; Pratt, J.; Randle, J. C. R.; Stutzmann, J. M.; Mignani, S., Indeno[1,2-b]pyrazin-2,3-diones: A new class of antagonists at the glycine site of the NMDA receptor with potent in vivo activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43* (12), 2371-2381.
6. Ammar, Y. A.; Ali, M. M.; Mohamed, Y. A.; Thabet, H. K.; El-Gaby, M. S. A., Cyanoacetanilide intermediates in heterocyclic synthesis. Part 7: Preparation of some spiro[indoline-3,4'-pyridine] and chromeno[3,4-c] pyridine derivatives. *Heterocyclic Communications* **2013**, *19* (3), 195-200.
7. Chen, T.; Xu, X. P.; Ji, S. J., Novel, one-pot, three-component route to indol-3-yl substituted spirooxindole derivatives. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2010**, *12* (5), 659-663.
8. Dandia, A.; Kumar, A.; Sehgal, V.; Rani, B., Novel synthesis of some fluorine containing spiro[indole-dihydropyridine] derivatives. *Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry* **1996**, *35* (12), 1314-1316.
9. Litvinov, Y. M.; Shestopalov, A. A.; Rodinovskaya, L. A.; Shestopalov, A. M., New convenient four-component synthesis of 6-amino-2,4-dihydropyrano[2,3-c] pyrazol-5-

carbonitriles and one-pot synthesis of 6'-aminospiro[(3H)-indol-3, 4'pyrano[2,3-c]pyrazol]-(1H)-2-on-5'-carbonitriles. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2009**, *11* (5), 914-919.

10. Zou, Y.; Hu, Y.; Liu, H.; Shi, D., Rapid and efficient ultrasound-assisted method for the combinatorial synthesis of spiro[indoline-3,4'-pyrano[2,3-c]pyrazole] derivatives. *ACS Combinatorial Science* **2012**, *14* (1), 38-43.

11. Cool, B.; Zinker, B.; Chiou, W.; Kifle, L.; Cao, N.; Perham, M.; Dickinson, R.; Adler, A.; Gagne, G.; Iyengar, R.; Zhao, G.; Marsh, K.; Kym, P.; Jung, P.; Camp, H. S.; Frevert, E., Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metabolism* **2006**, *3* (6), 403-416.

12. Hallakou-Bozec, S.; Charon, C.; Poeschke, O.; Hock, B., *Use of Thienopyridone Derivatives as AMPK Activators and Pharmaceutical Compositions Containing Them* **2007**.

13. Mirguet, O.; Sautet, S.; Clément, C. A.; Toum, J.; Donche, F.; Marques, C.; Rondet, E.; Pizzonero, M.; Beaufils, B.; Dudit, Y.; Huet, P.; Trottet, L.; Grondin, P.; Brusq, J. M.; Boursier, E.; Saintillan, Y.; Nicodeme, E., Discovery of pyridones as oral AMPK direct activators. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *4* (7), 632-636.

14. Peng, W.; Shreeve, J. M., Convenient fluorination of nitro and nitrile compounds with Selectfluor. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46* (29), 4905-4909.

15. Nyffeler, P. T.; Durón, S. G.; Burkart, M. D.; Vincent, S. P.; Wong, C. H., Selectfluor: Mechanistic insight and applications. *Angewandte Chemie - International Edition* **2004**, *44* (2), 192-212.

16. Shi, F.; Tao, Z.-L.; Luo, S.-W.; Tu, S.-J.; Gong, L.-Z., Scaffold-Inspired Enantioselective Synthesis of Biologically Important Spiro[pyrrolidin-3,2'-oxindoles] with Structural Diversity through Catalytic Isatin-Derived 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18* (22), 6885-6894.

17. Beinat, C.; Reekie, T.; Banister, S. D.; O'Brien-Brown, J.; Xie, T.; Olson, T. T.; Xiao, Y.; Harvey, A.; O'Connor, S.; Coles, C.; Grishin, A.; Kolesik, P.; Tsanaktsidis, J.; Kassiou, M., Structure–activity relationship studies of SEN12333 analogues: Determination of the optimal requirements for binding affinities at $\alpha 7$ nAChRs through incorporation of known structural motifs. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *95*, 277-301.

18. Aggarwal, R.; Singh, G.; Kaushik, P.; Kaushik, D.; Paliwal, D.; Kumar, A., Molecular docking design and one-pot expeditious synthesis of novel 2,5-diarylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amines as anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *101*, 326-333.
19. Tan, B.; Candeias, N. R.; Barbas, C. F., Core-structure-motivated design of a phosphine-catalyzed [3 + 2] cycloaddition reaction: Enantioselective syntheses of spirocyclopenteneoxindoles. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (13), 4672-4675.
20. McFerrin, C. A.; Hammer, R. P.; Fronczek, F. R.; Watkins, S. F., 3-Phenyl-1-(2-pyridyl)-1H-pyrazol-5-ol. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online* **2006**, *62* (6), o2518-o2519.
21. Kimata, A.; Nakagawa, H.; Ohyama, R.; Fukuuchi, T.; Ohta, S.; Suzuki, T.; Miyata, N., New series of antiprion compounds: Pyrazolone derivatives have the potent activity of inhibiting protease-resistant prion protein accumulation. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50* (21), 5053-5056.
22. Mojtahedi, M. M.; Javadpour, M.; Abaee, M. S., Convenient ultrasound mediated synthesis of substituted pyrazolones under solvent-free conditions. *Ultrasonics Sonochemistry* **2008**, *15* (5), 828-832.
23. Huang, Y. Y.; Lin, H. C.; Cheng, K. M.; Su, W. N.; Sung, K. C.; Lin, T. P.; Huang, J. J.; Lin, S. K.; Wong, F. F., Efficient di-bromination of 5-pyrazolones and 5-hydroxypyrazoles by N-bromobenzamide. *Tetrahedron* **2009**, *65* (46), 9592-9597.
24. García-Prieto, C. F.; Gil-Ortega, M.; Aránguez, I.; Ortiz-Besoain, M.; Somoza, B.; Fernández-Alfonso, M. S., Vascular AMPK as an attractive target in the treatment of vascular complications of obesity. *Vascular Pharmacology* **2015**, *67*, 10-20.
25. García-Prieto, C. F.; Pulido-Olmo, H.; Ruiz-Hurtado, G.; Gil-Ortega, M.; Aranguez, I.; Rubio, M. A.; Ruiz-Gayo, M.; Somoza, B.; Fernández-Alfonso, M. S., Mild caloric restriction reduces blood pressure and activates endothelial AMPK-PI3K-Akt-eNOS pathway in obese Zucker rats. *Vascular Pharmacology* **2015**, *65*, 3-12.
26. García-Prieto, C. F.; Hernández-Nuño, F.; Rio, D. D.; Ruiz-Hurtado, G.; Aránguez, I.; Ruiz-Gayo, M.; Somoza, B.; Fernández-Alfonso, M. S., High-fat diet induces endothelial dysfunction

through a down-regulation of the endothelial AMPK-PI3K-Akt-eNOS pathway. *Molecular Nutrition and Food Research* **2015**, 59 (3), 520-532.

27. Xu, L.; Ash, J. D., The role of AMPK pathway in neuroprotection. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016; Vol. 854, pp 425-430.
28. Venna, V. R.; Li, J.; Hammond, M. D.; Mancini, N. S.; McCullough, L. D., Chronic metformin treatment improves post-stroke angiogenesis and recovery after experimental stroke. *Eur. J. Neurosci.* **2014**, 39 (12), 2129-2138.
29. Glucose transport inhibitors. WO2016/12474, **2016**, Bayer Pharma, Aktiengesellschaft.
30. Aggarwal, R.; Singh, G.; Kaushik, P.; Kaushik, D.; Paliwal, D.; Kumar, A., Molecular docking design and one-pot expeditious synthesis of novel 2,5-diarylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amines as anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 101, 326 - 333.
31. Portilla, J.; Quiroga, J.; Nogueras, M.; Cobo, J., Regioselective synthesis of fused pyrazolo[1,5-a]pyrimidines by reaction of 5-amino-1H-pyrazoles and beta-dicarbonyl compounds containing five-membered rings. *Tetrahedron* **2012**, 68 (4), 988 - 994.
32. Huang, Y.-Y.; Wang, L.-Y.; Chang, C.-H.; Kuo, Y.-H.; Kaneko, K.; Takayama, H.; Kimura, M.; Juang, S.-H.; Wong, F. F., One-pot synthesis and antiproliferative evaluation of pyrazolo[3,4-d] pyrimidine derivatives. *Tetrahedron* **2012**, 68 (47), 9658 - 9664.
33. Vyas, D. J.; Froehlich, R.; Oestreich, M., Stereochemical surprises in the lewis acid-mediated allylation of isatins. *Journal of Organic Chemistry* **2010**, 75 (19), 6720 - 6723.
34. Ribeiro, C. J. A.; Praveen, K.; Moreira, R.; Santos, M. M. M., Efficient synthesis of spiroisoxazoline oxindoles. *Tetrahedron Letters* **2012**, 53 (3), 281 - 284.
35. Singh, P.; Paul, K.; Holzer, W., Synthesis of pyrazole-based hybrid molecules: Search for potent multidrug resistance modulators. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2006**, 14 (14), 5061 - 5071.
36. Khalil; Hassan; Mohamed; El, S., Phase-transfer catalyzed alkylation and cycloalkylation of 3-substituted-1H-pyrazol-2-in-5-ones in the absence or presence of carbon disulphide. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements* **2005**, 180 (2), 479 - 496.

37. Zou, Y.; Hu, Y.; Liu, H.; Shi, D., Rapid and efficient ultrasound-assisted method for the combinatorial synthesis of spiro[indoline-3,4'-pyrano[2,3-c]pyrazole] derivatives. *ACS Combinatorial Science* **2012**, *14* (1), 38 - 43.
38. Feng, J.; Ablajan, K.; Sali, A., 4-Dimethylaminopyridine-catalyzed multi-component one-pot reactions for the convenient synthesis of spiro[indoline-3,4'-pyrano[2,3-c]pyrazole] derivatives. *Tetrahedron* **2014**, *70* (2), 484 - 489.
39. Thienopyridone derivatives useful as activators of AMPK. EP2679591, **2014**,

CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones generales

Como se viene queriendo poner de relieve, el principal resultado que se ha pretendido alcanzar con esta Memoria es el desarrollo de programas de química médica que contribuyan al conocimiento del tremendo potencial terapéutico de AMPK y que sirvan como precedentes para trabajos encaminados al aprovechamiento farmacológico de esta diana. Las conclusiones más representativas del trabajo se recogen a continuación:

En el capítulo dos:

- Se ha sintetizado una familia de compuestos derivados de quinolona y aza-quinolona, empleando como etapa clave reacciones de acoplamiento de Suzuki, para lo cual se han puesto a punto condiciones de reacción en función de los productos de partida.
- Algunos de estos compuestos preparados han mostrado buenos valores de solubilidad termodinámica.
- Los compuestos preparados han demostrado activar AMPK tanto *in vitro* como en líneas celulares HEK-293.
- Los estudios de proliferación de linfocitos T, llevados a cabo con el compuesto **2.13a**, han mostrado actividad como potenciador de la producción de IL-4 e IL-10, citoquinas encargadas de coordinar respuestas antiinflamatorias.

En el capítulo tres:

- Se ha preparado una nueva familia de derivados fluorados de 2-oxoindoles como moduladores de AMPK.
- Los ensayos *in vitro* y los realizados en células revelan interrogantes sobre los mecanismos de acción de los compuestos, encontrando perfiles de activación/inhibición de AMPK dentro de la misma serie química.
- Los ensayos de viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de próstata ponen de relieve el potencial del compuesto **3.7d** como agente anticancerígeno.
- Los estudios de predicción *in silico* de las propiedades tipo fármaco de **3.7 d** lo validan como prototipo para el desarrollo de programas de química médica basados en el desarrollo de nuevos compuestos análogos.

En el capítulo cuatro:

- Se ha llevado a cabo la síntesis de una familia de compuestos que supone una incursión en un espacio químico inexplorado en el campo de la activación de AMPK, los espirocompuestos que combinan piridonas y los oxoindoles. Para ello, se han empleado reacciones de espirociclación, unas transformaciones químicas multicomponente que permiten obtener compuestos químicos de estructura compleja de forma rápida y sencilla, empleándose inicialmente para la preparación de la familia de derivados espiro[indolina-pirazol] piridona.
- Se ha desarrollado un método que permite la separación de buena parte de las parejas diastereoméricas de espiro[indolina-pirazol] piridona preparadas, consistente en la detención de un equilibrio de intercambio de protón que provoca la racemización de uno de los centros estereogénicos mediante la sustitución bioisótera hidrógeno-flúor. Este método ha permitido el análisis de las propiedades farmacológicas de cada pareja diastereomérica.
- Los estudios de activación de AMPK realizados sobre la familia de espiro[indolina-pirazol] piridona muestran una buena capacidad de unión a AMPK *in vitro* así como en células para el compuesto cabeza de serie (**4.5a**).
- Se ha llevado a cabo la preparación de una quimioteca, estructuralmente relacionada con el prototipo **4.5a** aprovechando la versatilidad de las reacciones de espirociclación, preparando tanto sistemas fusionados del tipo indolina-pirazol-piridina e indolina-pirano-pirazol, como sistemas sencillos del tipo indolina-piperidina y piperidona.
- Las modificaciones estructurales llevadas a cabo en la familia de espiro[indolina-pirazol] piridona han conducido a una mejora de la activación de AMPK en células con respecto al prototipo **4.5a**, encontrando en el derivado **4.9f** valores de activación de AMPK a nivel celular a concentraciones 10 veces inferiores que en el prototipo.
- Se han realizado estudios de activación en AMPK endotelial sobre el compuesto **4.5a** mostrando una buena actividad sobre AMPK en tejido vascular.